FACULTE DE MEDECINE DE PARIS

Année 1967 N°

T H E S E

POUR LE

DOCTORAT EN MEDECINE
DIPLOME D'ETAT

PAR

Jean-Pierre A L L A I N
né le 26 Janvier 1942 à Chateauroux (Indre)

Ancien Externe des Hôpitaux de Paris

Présentée et soutenue publiquement le :

LE FACTEUR PLAQUETTAIRE 3.

Son rôle dans la physiologie et la pathologie plaquettaire.

Président : Monsieur Jean BERNARD, Professeur .

F A C U L T E D E M E D E C I N E D E P A R I S

Année 1967 N°

T H E S E

POUR LE

DOCTORAT EN MEDECINE
DIPLOME D'ETAT

PAR

Jean-Pierre A L L A I N
né le 26 Janvier 1942 à Chateauroux (Indre)

Ancien Externe des Hôpitaux de Paris

Présentée et soutenue publiquement le :

LE FACTEUR PLAQUETTAIRE 3.

Son rôle dans la physiologie et la pathologie plaquettaire.

Président : Monsieur Jean BERNARD, Professeur .

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

15/1/1967

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. Alajouanine (T.), Bénard (H.), Bernard (E.), Binet (L.), Bulliard (H.), Cathala (J.), Chabrol (E.), Chailley-Bert (P.), Cheymol (J.), Debré (R.), Fey (B.), Gailliard (H.), Gaudart d'Allaines (F. de), Gennes (L. de), Giroud (A.), Hazard (R.), Heuyer (G.), Laroche (G.), Lavier (G.), Lelong (M.), Lévy (Mlle J.), Lévy-Solal (E.), Lian (C.), Marchal (G.), Mathieu (P.), Monod (R.), Moreau (R.), Moulonguet (P.), Pasteur Vallery-Radot, Petit-Dutaillis (D.), Piédelièvre (R.), Quénu (J.), Renard (G.), Senèque (J.), Strohl (A.), Tanon (L.), Verne (J.).

DOYEN . . . . . Georges BROUET.

1er ASSESSEUR . . . . . Daniel BARGETON

2e ASSESSEUR . . . . . Jean GOSSET

I. — PROFESSEURS

1° CHAIRES DE SCIENCES FONDAMENTALES

a) Professeurs titulaires :

	MM.
Anatomie	DELMAS (A.)
—	HUARD (P.)
Anatomie et cytologie pathologiques	DELARUE (J.)
Anesthésiologie	VOURC'H (G.)
Bactériologie et virologie	TOURNIER (P.)
Biochimie médicale	JAYLE (M.-F.)
—	POLONOVSKI (J.)
—	DESGREZ (P.)
Biologie appliquée à l'Education physique et aux Sports	MALMEJAC (J.)
Biologie médicale	FAUVERT (R.)
Biophysique médicale	BUGNARD (L.)
—	DOGNON (A.)
—	DJOURNO (A.)
Cancérologie expérimentale	MATHÉ (G.)
Chimie pathologique	SCHAPIRA (G.)
Génétique fondamentale	LEJEUNE (J.)
Histoire de la médecine et de la chirurgie	COURY (Ch.)
Histologie et Embryologie	TUCHMANN-DUPLESSIS (H.)
— —	COUJARD (R.)
Hygiène et médecine préventive	BOYER (J.)
Médecine du Travail	DESOILLE (H.)
Médecine légale, Droit médical et déontologie	DEROBERT (L.)
Microbiologie (Bactériologie et virologie)	FASQUELLE (R.)
Parasitologie	N...
Pathologie chirurgicale	LAURENCE (G.)
—	KUSS (R.)
—	VERNE (J.-M.)
Pathologie exotique	BRUMPT (L.-C.)
Pathologie expérimentale et comparée	MERKLEN (F.-P.)
Pathologie médicale	LAROCHE (Cl.)
—	BRICAIRE (H.)
—	PÉQUIGNOT (H.)
Pathologie respiratoire	TURIAF (J.)
Pathologie et thérapeutique générales	MAURICE (P.)
Pharmacologie	BOISSIER (J.-R.)
—	LECHAT (P.)
Physiologie	BARGETON (D.)
—	PARROT (J.)
Physiologie et pathologie obstétricales	LEPAGE (F.)
Radiologie médicale	DESGREZ (H.)

	MM.
Technique chirurgicale et Chirurgie expérimentale	N...
Therapeutique	LAMOTTE (M.)
Therapeutique appliquée	N...

b) Professeurs à titre personnel :

Anatomie	CABROL (Ch.)
Anatomie anthropologique	OLIVIER (G.)
Anatomie pathologique	NEZELOF (Ch.)
Bacteriologie	BARBIER (P.)
Biochimie medicale	DREYFUS (J.-Cl.)
Biologie medicale	BOURLIÈRE (F.)
Parasitologie	LARIVIÈRE (M.)
Pathologie expérimentale	LOEPER (J.)
Physiologie	DEJOURS (P.)
	SCHERRER (J.)
Physique médicale	KELLERSHOHN (L.)
	GOUGEROT (L.)
	ROUCAYROL (J.-Cl.)
	TUBIANA (M.)
Radiologie médicale	FISCHGOLD (H.)

2° CHAIRES DE SCIENCES CLINIQUES

a) Professeurs titulaires :

		MM.
Clinique carcinologique		DENOIX P.
Clinique carcinologique chirurgicale (Necker)		REDON (H.)
Clinique cardiologique (Broussais)		SOULIÉ (P.)
— — (Boucicaut)		LENÈGRE (J.)
Cliniques chirurgicales	Beaujon	LORTAT-JACOB (J.-L.)
	—	BAUMANN (J.)
	Cochin	LEGER (L.)
	Hôtel-Dieu	PATEL (J.)
	Saint-Antoine	GOSSET (J.)
	Salpêtrière	SICARD (A.)
	Tenon	OLIVIER (Cl.)
Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique (Cochin)		MERLE d'AUBIGNÉ (R.)
— — — (Foch)		PADOVANI (P.)
— — — (Beaujon)		CAUCHOIX (J.)
Clinique de chirurgie infantile et orthopédique (Enfants-Malades)		FÈVRE (M.)
Clinique de chirurgie cardio-vasculaire (Broussais)		DUBOST (Ch.)
Clinique de chirurgie thoracique (Laennec)		MATHEY (J.)
Clinique dermatologique (Saint-Louis)		DUPERRAT (F.)
Clinique endocrinologique (Pitié)		DECOURT (J.)
Clinique de Génétique médicale (Enfants-Malades)		LAMY (M.)
Clinique chirurgicale et gynécologique (Broca)		HUGUIER (J.)
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques (Saint-Louis)		DEGOS (R.)
Clinique des maladies des enfants (Enfants-Malades)		TURPIN (R.)
Clinique des maladies infectieuses (Claude-Bernard)		MOLLARET (P.)
Clinique des maladies mentales et de l'encéphale (Sainte-Anne)		DELAY (J.)
Clinique des maladies du sang (Broussais)		BERNARD (J.)
Clinique des maladies du système nerveux (Salpêtrière)		CASTAIGNE (P.)
Cliniques médicales	Bicêtre	DEPARIS (M.)
	Broussais	MILLIEZ (P.)
	Cochin	N...
	Hôtel-Dieu	BARIÉTY (M.)
	Pitié	DREYFUS (G.)
	Saint-Antoine	CONTE (M.)
	Saint-Antoine	KOURILSKY (R.)
	Saint-Antoine	BOUDIN (G.)

	MM.
Clinique d'hydrologie et de climatologie (Bichat)	DEBRAY (Ch.)
Clinique médicale infantile et pédiatrie sociale (Enfants-Malades)	MARIE (J.)
Clinique médicale propédeutique (Broussais)	JUSTIN-BESANÇON (L.)
Clinique médico-sociale du diabète sucré et des maladies métaboliques (Hôtel-Dieu)	DEROT (M.)
Clinique néphrologique (Necker)	HAMBURGER (J.)
Clinique de neuro-chirurgie (Pitié)	DAVID (M.)
Clinique neurologique (Salpêtrière)	GARCIN (R.)
Cliniques obstétricales — Baudelocque	LACOMME (M.)
Cliniques obstétricales — Saint-Antoine	MERGER (R.)
Clinique obstétricale et gynécologique (Port-Royal)	VARANGOT (J.)
Clinique ophtalmologique (Hôtel-Dieu)	OFFRET (G.)
— — (Cochin)	BREGEAT (P.)
Clinique oto-rhino-laryngologique (Lariboisière)	AUBRY (M.)
Clinique de pédiatrie (Trousseau)	MOZZICONACCI (P.)
Clinique de pédiatrie et de puériculture (Saint-Vincent-de-Paul)	THIEFFRY (S.)
Clinique de pneumo-phtisiologie (Laennec)	BROUET (G.)
Clinique de neuro-psychiatrie infantile (Salpêtrière)	MICHAUX (L.)
Clinique de rhumatologie médicale et sociale (Cochin)	COSTE (F.)
Clinique de rhumatologie (Lariboisière)	SÈZE (S. de)
Clinique stomatologique (Salpêtrière)	DECHAUME (M.)
Clinique thérapeutique chirurgicale (Vaugirard)	ROUX (M.)
Clinique thérapeutique médicale (Saint-Antoine)	LEMAIRE (A.)
Clinique toxicologique (F. Widal)	GAULTIER (M.)
Clinique traumatologique et orthopédique (R.-Poincaré)	JUDET (R.)
Clinique urologique (Cochin)	ABOULKER (P.)
— — (Necker)	COUVELAIRE (R.)
Hygiène et clinique de la première enfance (Trousseau)	LAPLANE (R.)
Séméiologie médicale (A. Chantin)	DOMART (A.)
— — (Lariboisière)	BOUVRAIN (Y.)
— — (Pitié)	RAMBERT (P.)
— — (Rothschild)	WOLFROMM (R.)
Séméiologie et clinique chirurgicales (Broussais)	POILLEUX (F.)

b) **Professeurs à titre personnel :**

Hématologie	ANDRÉ (R.)
	BOUSSER (J.)
Hydrologie et climatologie	GIBERTON (A.)
Maladies infectieuses	BASTIN (R.)
Médecine	AZERAD (E.)
	BOUR (H.)
	CAROLI (J.)
	DREYFUS (B.)
	GROSSIORD (A.)
	LAMBLING (A.)
	LAUNAY (Cl.)
	PAYET (M.)
	PERRAULT (M.)
	SIGUIER (F
	WORMS (R.)
Néphrologie	RICHET (G.)
Neuro-chirurgie	LE BEAU (J.)
Neurologie	LHERMITTE F.
Neuro-psychiatrie	PICHOT (P.)
Oto-Rhino-Laryngologie	MADURO (R.)
Pédiatrie	POLONOVSKI (Cl.)
	ROYER (P.)
Pneumo-Phtisiologie	KREIS (B.)
	MEYER (A.)
Rhumatologie	DELBARRE (F.)

II. — PROFESSEURS SANS CHAIRE

	MM
Anatomie pathologique	GOUYSOU (Ch.)
Bactériologie	CHRISTOL (D.)
Biochimie médicale	CARTIER (P.) GONNARD (P.) NORDMANN (J.)
Biologie médicale	HARTMANN (L.)
Chirurgie	CERBONNET (G.)
Hématologie	BILSKI-PASQUIER (G.)

	MM.
Maladies infectieuses	DUPONT (V.)
Neuro-psychiatrie	TARDIEU (G.)
Pédiatrie	ROSSIER (A.)
Physique médicale	COURSAGET (J.) GREMY (F.)
Physiologie	GIRARD (Fr.)
Stomatologie	CHAPUT (Mme A.)

III. — PROFESSEURS DÉTACHÉS DANS LES UNIVERSITÉS ÉTRANGÈRES

Bactériologie	HAUDUROY (P.) Pr. s. ch.
Pathologie chirurgicale	RUDLER (J.) Pr. s. ch.

IV. — PROFESSEURS ASSOCIÉS

Hormonologie	MORICARD (R.)
Statistique médicale et épidémiologique	SCHWARTZ (D.)

Secrétaire général de la Faculté	M. LENA (J.)
Conseiller administratif	Mlle CHAINTREUIL (G.)
Conservateur en Chef de la Bibliothèque Conservateur du Musée d'Histoire de la Médecine	M. le Docteur HAHN (A.)
Conservateurs	Mlles DUMAITRE (P.), LAURENT (H.), LE NOIR (G.)
Bibliothécaires	Mmes CONTET (J.), FORGET (F.), Mlles DUROZOY (M.-F.), ROBERGE (D.), Dr SCHILLER (J.)

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A ma femme et à mes enfants,

A ma mère et à mon père,

A mes beaux-parents,

A mes soeurs et à mes beaux-frères,

A mes amis.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544305_0029

A mon Maître

Monsieur le Professeur Jean BERNARD

Professeur de Clinique des Maladies du Sang.

Qui m'a fait l'honneur d'accepter

la présidence de cette thèse.

En témoignage de ma grande admiration

et de mon respectueux attachement.

A Monsieur le Professeur Agrégé Jacques CAEN

Qui a bien voulu me confier le sujet de cette thè
et me guider avec bienveillance au cours de ce
travail

Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissanc
et de mon attachement.

A mes Maîtres dans les Hôpitaux de Tours,

STAGE

M. le Docteur LIEFFRING

M. le Docteur GAUTIER

A mes Maîtres dans les Hôpitaux de Paris,

EXTERNAT

M. le Professeur KUSS

M. le Professeur REDON

M. le Docteur CANIVET

M. le Docteur LESOBRE

M. le Professeur HAMBURGER

M. le Professeur Jean BERNARD

M. le Docteur DAUSSET

A Madame le Docteur M.J. LARRIEU

Avec mes remerciements pour son enseignement
et ses conseils toujours précieux.

A Monsieur le Professeur Agrégé M. SELIGMANN

A Monsieur le Professeur Agrégé Y. NAJEAN .

INTRODUCTION

Les progrès de nos connaissances de la physiologie de l'hémostase et de sa physiopathologie sont étroitement liés à l'évolution des techniques. Les maladies de la coagulation, en particulier, les déficits congénitaux, ont permis de découvrir successivement l'existence des facteurs II (Prothrombine), V (Proaccélérine), VII (Proconvertine), VIII (facteur anti-hémophilique A), IX (facteur anti-hémophilique B), X (facteur Stuart), XI (facteur ITA), XII (facteur Hageman) et XIII (facteur de stabilisation de la fibrine).

Les maladies de l'hémostase primaire sont encore loin de cette simplicité. La standardisation des tests mesurant le temps de saignement a permis de séparer les maladies avec allongement du temps de saignement, elles-mêmes divisées en plusieurs groupes :

- Allongements isolés du temps de saignement où aucune autre anomalie n'est décelée.

- Allongements du temps de saignement liés à un déficit plasmatique dont le plus connu et sans doute le plus fréquent est la maladie de Willebrand.

- Allongements du temps de saignement liés à un déficit plaquettaire. En dehors des thrombopénies, on a distingué dans ce groupe deux types de désordres :

- Temps de saignement allongé avec anomalies fonctionnelles (adhésion, agrégation, rétraction du caillot) mais sans trouble de la coagulation, représenté essentiellement par la thrombasthénie de Glanzmann.

- Temps de saignement allongé sans anomalie fonctionnelle autre qu'un trouble de la coagulation lié aux plaquettes, c'est-à-dire, du facteur plaquettaire 3. On reconnait dans ce groupe la Dystrophie Thrombocytaire Hémorragipare (DTH), le syndrome de Willebrand-Jürgens.

Nous avons pu, au laboratoire d'hémostase (Prof. J. CAEN) du Service de Monsieur le Professeur Jean BERNARD, étudier onze cas de désordres congénitaux de l'hémostase (3 D.T.H., 3 Thrombasthénies, 5 allongement du temps de saignement) et deux cas de désordres acquis (1 leucémie myéloïde chronique et 1 splénomégalie myéloïde). Nous avons tenté de reconnaitre par des tests parfaitement standardisés si la distinction établie dans les thrombopathies devait être conservée.

Après un rappel de la physiologie de l'hémostase primaire et des plaquettes, de la biochimie et de la biologie du facteur plaquettaire 3 et des techniques permettant de le doser, nous avons revu brièvement la classification et les caractéristiques des thrombopathies congénitales et acquises. Nos treize malades ont été étudiés d'un point de vue clinique, biologique et leur facteur plaquettaire 3 dosé à l'aide de deux techniques personnelles .

RAPPEL DE PHYSIOLOGIE

Le rôle des plaquettes dans la physiologie de l'hémostase est multiple. Elles interviennent non seulement dans l'hémostase primaire, la coagulation, la rétraction du caillot où elles sont indispensables, mais encore dans la fibrinolyse et la protection des vaisseaux .

I. - L'hémostase primaire rassemble les séquences initiales conduisant à la formation du clou plaquettaire capable d'arrêter le saignement d'un petit vaisseau lésé .

Elle est schématisée en trois étapes qui sont en réalité intriquées :

- Adhésion très rapide aux fibres de collagène mises à nu par la lésion de la paroi vasculaire .

- Agrégation des plaquettes entre elles, phénomène réversible, formant un premier thrombus lâche, perméable.

- Modifications irréversibles des plaquettes agrégées, désignées sous le nom de métamorphose visqueuse (M.V.) .

Les plaquettes adhèrent en 2 à 3 secondes aux fibres de collagène sous-endothéliales. Cette adhésion est irréversible, car elle résiste aux lavages; indépendante des ions Ca ++ et Mg ++; indépendante de la coagulation car elle n'est pas inhibée par l'héparine et elle est normale dans tous les déficits congénitaux en facteurs de coagulation. Le mécanisme de cette adhésion est inconnu, mais elle ne peut se produire que sur du collagène sous forme fibrillaire provenant d'un tissu conjonctif lésé .

L'adhésion des plaquettes au collagène est suivie d'une agrégation des plaquettes entre elles. Ce phénomène, réversible, nécessite la présence d'Adénosine Di Phosphate (ADP), d'ions Ca ++ et Mg ++, de cofacteurs plasmatiques .

Les plaquettes doivent être viables, posséder un système glycolytique intact et une membrane en bon état .

En 1960, HELLEM (42) a montré qu'il existait dans les hématies un facteur thermostable, dialysable, dit facteur "R", capable d'induire l'agrégation des plaquettes. GAARDER, en 1961 (34) l'identifie à l'ADP. L'initiation du phénomène d'agrégation plaquettaire revient à l'ADP libérée par l'interaction entre les plaquettes et le tissu sous-endothélial lésé. Les globules rouges "activés" au cours des mêmes séquences fournissent également de l'ADP. Mais les plaquettes elles-mêmes restent le principal générateur d'ADP. Celle-ci provient de la dégradation de l'ATP (Adénosine tri phosphate) intra-plaquettaire sous l'action de deux inducteurs le collagène et la thrombine :

- Le collagène est capable d'agréger les plaquettes par l'intermédiaire de l'ADP qu'il libère (HOVIG, 49) par un mécanisme encore inconnu. Il semble cependant (HOLMSEN) qu'en utilisant de l'ADP marquée C14, l'ADP libérée provient d'un pool différent de celui qui intervient dans le catabolisme de l'ATP. En d'autres termes, il s'agirait d'une ADP préformée .

- La thrombine formée à partir de la thromboplastine tissulaire exogène libérée à la lésion du vaisseau et de la prothrombine périplaquettaire, mais aussi à partir des facteurs de la coagulation adsorbés à la surface de la plaquette, libérerait l'ADP en agissant sur le fibrinogène plaquettaire mais aussi sur une autre protéine (peut être le facteur XIII) comme il résulte des expériences faites dans les afibrinogénémies congénitales .

L'agrégation plaquettaire est bloquée par l'EDTA (Ethylène-diamine-Tetracétique-Acide), le citrate et l'oxalate de sodium à fortes concentrations. La concentration en ions Ca ++ et Mg ++ utile est très basse et seul le Calcium est indispensable (HOVIG, 50) .

BORN (14), INCEMAN et CAEN (54), GUGLER et LUSCHER ont montré que le fibrinogène plasmatique était un cofacteur de l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP. DEYKIN (28) a mis en évidence deux cofacteurs :

- le fibrinogène (l'agrégation des plaquettes d'afibrinogénémies congénitales est très perturbée en présence de faibles doses d'ADP) .

- Une protéine plasmatique dont les principaux caractères sont d'être thermostable et non consommée au cours de la coagulation : le plasma défibriné chauffé à 56° C et le sérum induisent un certain degré d'agrégation, supérieur au tampon en présence de plaquettes lavées, et de doses optimales d'ADP et de fibrinogène .

De nombreuses théories ont été proposées pour expliquer l'agrégation. La plus classique est celle de GAARDER (35) dite du pont calcique. SALZMAN (82) pense que l'excès d'ADP inhiberait la réaction ATP ---- ADP sous la dépendance de l'ATPase de membrane. Le blocage de cette réaction découvrirait les sites adhésifs et permettrait l'agrégation.

En présence de faibles quantités d'ADP (1.10^{-6} M), l'agrégation d'un plasma citraté riche en plaquettes est rapidement suivi d'une désagrégation (BORN) (13). Ce phénomène est dû à l'Adénosine Monophosphate (AMP) et à l'Adénosine. Ces deux composés sont des inhibiteurs de l'agré - gation à l'ADP. L' ATP est également inhibiteur et agirait lui aussi par compétition enzymatique avec l'ADP au niveau des sites de l'agrégation. Il existe, par ailleurs, dans le plasma des enzymes dégradant l'ADP, tels l'adenylatkinase et d'autres ADPases dont le rôle est fortement suspecté (SINAKOS et CAEN) .

In vivo, l'agrégation plaquettaire est théoriquement réversible, en réalité, elle devient rapidement irréversible lorsque la quantité d'ADP libérée des plaquettes par le collagène et la thrombine, dépasse les possibilités de l'inhibition.

Les plaquettes agrégées sont encore presque intactes. Elles ont perdu quelques granules, mais la membrane parait intacte. Les modifica - tions irréversibles des plaquettes survenant alors permettent l'obturation des fins canaux intrathrombiques et sont désignées sous le terme global de métamorphose visqueuse (M.V.).

On associe sous ce terme des modifications morphologiques :

- gonflement
- dégranulation
- agrégation
- formation de pseudopodes
- contraction des agrégats,

la libération de différents constituants plaquettaires :

- sérotonine
- adrénaline
- histamine
- facteurs de coagulation, tel le "facteur plaquettaire 3"
- facteur intervenant dans la fibrinolyse
- nucléotides
- enzymes,

- des phénomènes biochimiques (61) :

- stimulation du métabolisme intermédiaire
- dégradation et resynthèse partielle de l'ATP
- dégradation partielle de l'ADP
- formation d'AMP
- activation de la thrombosthénine, ATPase à activité et structure voisine de l'actomyosine musculaire

- des phénomènes annexes mais importants :

- incorporation des agrégats plaquettaires dans le réseau de fibrine, mais aussi adhésion plaquettaire au réseau de fibrine qui semble avoir sous sa dépendance la rétraction du caillot (CAEN, LASNERET, MICHEL)

Le collagène (HUGUES, 52) et la thrombine, capables tous les deux d'induire la libération d'ADP plaquettaire peuvent déclencher la métamorphose visqueuse.

II. - Le rôle des plaquettes dans la coagulation est double. Elles interviennent par les facteurs plasmatiques de coagulation absorbés à la surface des plaquettes (atmosphère plasmatique péri-plaquettaire) et par un certain nombre de facteurs purement plaquettaires, en particulier, le facteur phospholipidique ou facteur plaquettaire 3.

La quasi totalité des facteurs plasmatiques de coagulation ont été reconnus à la surface des plaquettes.

- le fibrinogène (Facteur I) parait être sous deux formes : facilement éluable et fortement lié

- la proaccélérine (Facteur V) était aussi désignée sous le nom de facteur I plaquettaire car elle est très solidement fixée à la membrane et n'est éluée qu'après de nombreux lavages.

Le facteur antihémophilique A (Facteur VIII), le facteur Stuart (Facteur X), le facteur Hageman (Facteur XII) et le facteur contact activés sont aussi trouvés à la surface plaquettaire. La présence du facteur anti-hémophilique B (Facteur IX) et du facteur PTA (Facteur XI) n'est pas encore assurée. Quoiqu'il en soit, il est hautement probable que ces protéines sont capables de former de la thromboplastine active endogène puis de transformer la prothrombine en thrombine capable d'induire des modifica - tions plaquettaires telles que la libération d'ADP et la métamorphose visqueuse.

Les facteurs purement plaquettaires sont désignés par un chiffre arabe.

- le facteur 2 plaquettaire est un accélérateur de la fibrino-formation sans équivalent plasmatique.
- le facteur 4 plaquettaire a une action anti-héparine directe; c'est une protéine thermostable.
- le facteur stabilisateur de la fibrine (Facteur XIII a été reconnu récemment (LUSCHER) comme un véritable constituant plaquettaire.
- le facteur plaquettaire 3 ou facteur phospho - lipidique est le plus connu de ces facteurs. Il intervient dans la coagulation.

Les phospholipides plaquettaires interviennent à un stade tardif de la thromboplastino-formation endogène ou intrinsèque. La coagulation endogène fait appel à des facteurs plasmatiques, qui, au cours de la chaîne de réaction dite "en cascade" , passent successivement de la forme inactive de substrat à la forme active d'enzyme.

L'initiation de la chaîne de réaction est réalisée par le contact du facteur XII (Hageman) avec la surface vasculaire lésée . Ainsi activé, le facteur XII entraine l'activation du facteur XI (Plasma thromboplastine antécédent ou PTA) . Le facteur XII joue le rôle d'enzyme et le facteur XI celui de substrat. Cette réaction est indépendante du calcium ionisé.

Le facteur XI activé entraine à son tour l'activation du facteur IX (facteur anti-hémophilique B) en présence de calcium ionisé.

Le facteur IX activé réagit ensuite avec le facteur VIII (facteur anti-hémophilique A) en présence de calcium ionisé. Le facteur VIII activé est consommé au cours de la coagulation par destruction ou par inhibition .

L'enchaînement des réactions suivantes est encore controversé. Pour RATNOFF, le VIII activé est à son tour capable de transformer le facteur X (Stuart) en X activé. Ce dernier produit serait l'enzyme capable de transformer la prothrombine en thrombine en présence de phospholipide plaquettaire (ou érythrocytaire ?) . Le facteur V activé (par la thrombine formée ?) est un accélérateur puissant de la réaction. D'autres auteurs pensent que le facteur V est transformé par le facteur VIII activé en un enzyme (Facteur V a) capable d'activer le facteur X en présence de phospholipides. Le facteur X activé serait alors la thromboplastine active, transformant molécule à molécule la prothrombine en thrombine.

Quoiqu'il en soit, les phospholipides plaquettaires joueraient ici le même rôle de catalyseur de surface. Le mécanisme est encore totalement inconnu, mais l'importance de la charge électrique de surface semble en faveur de cette hypothèse .

LE FACTEUR PLAQUETTAIRE 3

A) HISTORIQUE .

En 1912, HOWELL (51) reconnait une activité coagulante à des lipoprotéines extraites de tissus humains. Il s'agit de phosphatides dont les propriétés sont dites de "céphaline" .

WODSWORTH et coll. (99) séparent plusieurs fractions et ne trouvent aucune activité prothromboplastique à la lécithine.

Parallèlement à ces découvertes biochimiques, CHARGAFF et coll. 1936 (27) montrent que les extraits lipidiques plaquettaires possèdent une activité coagulante et BRINKHOUS en 1939 (16) que la prothrombine est moins utilisée au cours de la coagulation d'un plasma pauvre en plaquettes que du sang total. Cette notion est reprise en 1949 par BUCKWALTER et coll. (17) qui notent un parallélisme évident entre l'utilisation de la prothrombine et le chiffre de plaquettes.

L'activité coagulante des plaquettes et celle des phospholipides tissulaires a, plus tard, été attribuée aux mêmes composés et la céphaline couramment substituée aux plaquettes dans les tests d'hémos - tase.

Le terme probablement impropre de facteur plaquettaire 3 désigne l'activité prothromboplastique liée aux phospholipides plaquettaires .

B) ANALYSE CHIMIQUE

Les méthodes d'extractions et de séparation des lipides plaquettaires sont actuellement bien connues (62, 65, 100, 92).

- A partir d'un concentré plaquettaire, les lipides totaux sont extraits par le chloroforle-méthanol, après plusieurs passages. Ils représentent de 15 à 25% du poids sec de plaquettes selon les auteurs.

On peut diviser cet extrait brut en deux fractions:

- la fraction lipidique neutre qui contient :
  38% de mono, di et triglycérides
  6% de cholestérol estérifié

  Un grand nombre d'acides gras non saturés et leurs esters.

- la fraction phospholipidique. Seule cette dernière possède une activité coagulante.

Temps obtenus en génération de thromboplastine après 10' d'incubation, MARCUS(65)	lipides totaux	triglycérides	cholestérol	phospholipides
	10 "	109 "	124 "	10 "

Le fractionnement des phospholipides se fait par chromatographie sur colonne d'acide silicique . Deux fractions sont obtenues :

- l'une ninhydrine +, choline -
- l'autre ninhydrine -, choline +

Chacune est un mélange de plusieurs composés phospholipidiques qui peuvent être séparés par chromatographie bidimensionnelle sur papier.

La première fraction dite "céphaline" se sous-divise en :

- phosphatidyl éthanolamine (P E)
- phosphatidyl sérine (P S)
- inositol phosphatide (I P)

Il a été longtemps très difficile de séparer P E et P S. C'est en 1962 que cela a pu être réalisé par double chromatographie sur acide silicique et acide silicique ammoniaqué (65).

La fraction I.P. contient toujours une petite quantité de P.S. .

La seconde fraction est décomposée en :

- lécithine (L)
- sphingomyéline (S)

Une sixième fraction est présente; elle contient du phosphore mais pas d'azote. Il s'agirait peut-être d'acide phosphatidique.

Par ailleurs, certains auteurs (100) ont divisé P E en deux sous-fractions PE_I et PE_2 .

Une étude plus approfondie de la composition chimique de ces phospholipides a pu être réalisée .

- P E présente en α' un acide gras saturé : l'acide stéarique et en β un acide gras non saturé : l'acide arachidonique.

Le premier représente 15 moles pour cent, le second 36 moles pour cent.

Elle est d'autre part très riche en aldéhydes gras et le rapport $\frac{\text{acides gras saturés + aldéhydes gras}}{\text{acides gras non saturés}}$ est voisin de 1

- P S possède comme P E de l'acide stéarique en α' et arachidonique en β , mais ici, le premier est à 46 moles pour cent et le second à 25 moles pour cent.

Le rapport :

$\frac{AGS + AG}{AGNS}$ est, là encore, voisin de l'unité .

- I P comme P S est riche en stéarate, oléate et arachidonate, mais l'acide arachidonique est présent en plus grande quantité et l'acide oléique en quantité moindre.

- L contient 34 moles pour cent d'un acide gras saturé : l'acide palmitique et 31 moles pour cent d'un acide gras non saturé : l'acide oléique, Elle contient moins d'acide arachidonique que P E et très peu d'aldéhydes.

Tableau Récapitulatif

	Acides gras saturés	Acides gras non saturés	Aldéhydes
P E	stéarique 15 moles %	arachidonique 36 moles %	riche
P S	stéarique 46 moles %	arachidonique 25 moles %	riche
L	palmétique 31 moles %	oléique 31 moles %	pauvre

C) ACTIVITE COAGULANTE

L'étude de l'activité coagulante de ces différentes fractions phospholipidiques a donné des résultats différents selon les auteurs.

Pour WOODSIDE et THERRIAULT (100) P E et P S ont une forte activité coagulante .

	Lip. Totaux	P E_1	P E_2	P S	I P	L	S	PPP seul
Temps de recal - cification d'un PPP en seconde	61	53	51	48	170	175	169	175

Les associations de composés peuvent avoir une action synergique, en particulier, P S + P E, P S + L .

(Poids de substance nécessaire à la conversion de 100 u de prothrombine en thrombine.)

P S	P E	P S + P E ($\frac{1}{1}$)	P S + L ($\frac{1}{2}$)
20 µg	18 µg	2 µg	1 µg

Les résultats obtenus par plusieurs auteurs (65,92) sont quelque peu différents. Ils mesurent l'activité des phospholipides par le test de génération de la thromboplastine.

Temps obtenu après 10' d'incubation

MARCUS (65)

	P E	P S	I P (+ P S)	L	S	Lip. Tx.
	90"	10"	8"	90"	90"	9"
concentration protéique en µg/ml	toutes(C)	2,5	2,2	toutes(C)	toutes (C)	11,7

Mesurée par le temps de recalcification d'un PPP, l'activité de ces composés est quelque peu différente.

Pour une concentration de 2 µg/ml

MARCUS (65)

	P E	P S	I P (+ P S)	L	S	Lip. Tx.
TC en sec.	115"	100"	100"	200"	200"	55"

Les résultats de ces expériences sont apparemment contradictoires. P S, seule, est capable de générer la thromboplastine; P E peut, comme P S, raccourcir le temps de recalcification d'un plasma déplaquettisé mais à un degré moindre. Dans ces deux tests, l'activité de I P parait bien dûe à la notable proportion de P S qu'il contient.

La concentration protéique optimum est voisine de 2 µg/ml et au-delà de 100µg/ml, P E et P S ont une indiscutable activité anticoagulante. Il est difficile de localiser l'activité coagulante des plaquettes sur la seule Phosphatidyl-Serine. En effet, à concentration protéique égale, la P S qui représente 4% des lipides plaquettaires totaux, a une activité seulement 5 fois plus grande. Il faut donc admettre que les méthodes de purification diminuent l'activité de P S ou que d'autres lipides plaquettaires sont capables d'avoir une activité propre ou d'augmenter celle de la P S . Il semble que cette dernière hypothèse soit la plus satisfaisante. En bref, l'activité coagulante semble bien être portée par P S, mais P E d'une part et L augmentent très sensiblement cette activité, tandis que L seule n'en a pas.

D) ROLE DES CONDITIONS PHYSIQUES

Si la nature chimique des composés phospholipidiques conditionne leur activité coagulante, plusieurs auteurs (74) ont fait apparaitre l'importance des conditions physiques de cette activité.

Ils ont étudié l'activité coagulante de mélange de phospholipides en émulsion (P S + P E, P S + L, P E + L) et de la P S seule en fonction de leur charge électrique et du pH du milieu.

Dans tous les mélanges, l'activité thromboplastique est maximum pour une charge constante correspondant à une mobilité électrophorétique de $4,5 \times 10^{-4}$ cm^2 sec^{-1} $volt^{-1}$.

P S seule a une charge électrique un peu plus négative que celle correspondant à cet optimum, et l'addition de L ou de P E, en diminuant cette charge permet d'atteindre les conditions optimales.

Il semble donc que l'activité thromboplastique d'une émulsion phospholipidique dépende en grande partie des conditions physico-chimiques : charge de surface, structure micellaire et probablement d'autres facteurs non mis en évidence.

E) AUTRES SOURCES DE PHOSPHOLIPIDES

Les plaquettes ne sont pas les seuls éléments figurés du sang doués d'une activité thromboplastique. Les globules rouges, en particulier, possèdent un facteur coagulant dit " Erythroplastine " (36).

L'étude analytique des phospholipides du plasma et des éléments figurés du sang a été réalisé par plusieurs auteurs (10, 92). La Phosphatidyl éthanolamine, la Phosphatidyl sérine, l'Inositol Phosphatide, la Lécithine et la Sphingo myéline ont été reconnus dans les globules rouges comme dans les plaquettes. Leur répartition est légèrement différente : dans les hématies, P S est en quantité un peu plus grande et P E en quantité un peu moindre, il n'y a pas de plasmalogène éthanolamine.

A concentration protéique égale, l'activité coagulante des différents phospholipides ou de leurs associations est identique pour les deux types de cellule.

Le plasma ne contiendrait pas de P S mais seulement une quantité non négligeable de P E .

Les hématies sont donc capables d'avoir une activité coagulante in vitro et il n'est pas exclu que cette éventualité soit réalisée in vivo au cours de l'hémolyse .

LOCALISATION DU FACTEUR PLAQUETTAIRE 3

Ce difficile problème a été abordé par deux méthodes tout à fait différentes :

a) MARCUS et coll. (67, 69) ont tenté de localiser l'activité coagulante des plaquettes en séparant la membrane des granules plaquettaires.

Les plaquettes isolées sont tout d'abord rompues par les ultrasons, puis ultracentrifugés. Deux bandes principales sont obtenues :

- une couche inférieure dite granulaire contenant des granules, des mitochondries, des fragments de membrane.

- une couche supérieure homogène faite d'un mélange de fragments membranaires, d'enzymes solubles et de lipoprotéines.

Il parait impossible de rompre totalement des plaquettes sans abimer les granules et d'obtenir un fractionnement parfait. L'étude de l'activité coagulante est constamment faussée par le mélange des deux fractions. Néanmoins, les résultats obtenus par ces auteurs avec deux techniques : génération de thromboplastine, temps de Stypven, sont concordants.

A des concentrations protéiques comparables, la fraction membranaire possède une activité coagulante comparable à celle de l'homogénat des deux fractions. La fraction granulaire est moins active.

Après extraction des phospholipides contenus dans chaque fraction et dosage de leur activité coagulante à concentration protéique égale, les résultats sont identiques. Il est vraisemblable que les phospho - lipides membranaires soient plus disponibles pour réagir avec les facteurs plasmatiques que ceux liés aux granules.

Dans ce fractionnement, on obtient une couche supérieur de matériel soluble qui possède une activité coagulante. Il s'agirait d'une fraction non sédimentable du facteur plaquettaire 3 (47, 48).

b) En étudiant la libération du facteur plaquettaire 3 de plaquettes activées par le kaolin, plusieurs auteurs (38, 91) ont noté :

- que la présence de kaolin raccourcissait de façon importante le temps de récalcification d'un plasma riche en plaquettes normales, proportionnellement au temps d'incubation.

- dans le même temps, la photographie au microscope électronique de ces mêmes plaquettes montrait qu'elles adhéraient aux particules de kaolin et que les membranes n'étaient pas rompues.

- par ailleurs, le simple lavage des plaquettes libère des phospholipides retrouvés et dosés dans le surnageant.

Ces observations conduisent à penser que la membrane plaquettaire est la première source de facteur plaquettaire 3 utilisable dans la coagulation et probablement la plus importante .

LIBERATION DU FACTEUR PLAQUETTAIRE 3

Cette séquence de l'hémostase reste encore très obscure malgré les nombreux travaux qui lui ont été consacrés (40, 47, 91).

Les premières hypothèses plaçaient cette libération lors de la dégranulation, au cours de la métamorphose visqueuse, après rupture de la membrane plaquettaire.

En effet, après la rupture physiologique des plaquettes, un choc osmotique ou après ultra-sons, le facteur plaquettaire 3 est libéré.

Des études récentes ont mis en évidence la participation de nombreux mécanismes concourant à cette libération bien avant la métamorphose visqueuse. Le facteur plaquettaire 3 serait "disponible" dès l'adhésion des plaquettes au collagène et leur agrégation (26, 91, 47).

Le P R P, incubé avec le kaolin en milieu citraté, recalcifié, libère du facteur plaquettaire 3 sans que la membrane soit rompue. Il n'y a pas de libération, si le plasma est sequestréné, car il n'y a pas d'agrégation plaquettaire.

L'agrégation des plaquettes entre elles, en présence d'ADP augmente la libération du facteur plaquettaire 3 (26, 40) mesuré par le temps de Stypven.

Cette libération croît avec la concentration d'ADP ; elle est nettement diminuée en présence d'inhibiteurs de l'ADP, tels que la 2-chloroadénosine et la 2-méthyl-thioadénosine, de même, en présence d'un excès d'AMP ou d'ATP qui sont des inhibiteurs compétitifs de l'agrégation à l'ADP.

D'autre part, la libération de facteur plaquettaire 3 est très diminué dans les afibrinogénémies congénitales ce qui ne surprend pas quand on connait le rôle du fibrinogène comme cofacteur de l'agrégation plaquettaire (54, 40). Par ailleurs, elle est anormale dans les thrombas - thénies (CAEN et al. 22) dont le trouble fondamental est l'inagrégabilité des plaquettes à l'ADP.

Les ions Ca^{++}, le fibrinogène, l'ADP indispensables à l'agrégation des plaquettes, sont nécessaires à la libération précoce du facteur plaquettaire 3 dans l'hémostase primaire. Le rôle même des facteurs plaquettaires, tel le fibrinogène a été évoqué (CAEN, VAINER et GAUTIER)

A cette étape de l'hémostase primaire, la plaquette est encore presque intacte ; du moins la membrane n'est pas rompue. Le facteur plaquettaire 3 pourrait alors agir sous trois formes :

a) Une forme soluble (non sédimentable) (47, 48) . Les méthodes de fractionnement plaquettaire avaient déjà mis en évidence une couche de matériel soluble (sans membrane ni granule) pourvue d'une activité coagu - lante. Cet auteur mesure l'activité du sérum obtenu après recalcification d'un plasma riche en plaquettes. Environ 15% . du facteur plaquettaire 3 disponible dans ce PRP est retrouvé sous forme non sédimentable. Une petite fraction de matériel soluble ayant une activité facteur plaquettaire 3 semble donc quitter les plaquettes et entrer dans le milieu extérieur.

b) WHITE et KRIVIT (98) ont observé au microscope électronique, un plasma riche en plaquettes avant toute agrégation. Certains granules plaquet- taires se transforment en des particules tout à fait comparables à des micelles lipidiques. Ces micelles sortent de la plaquette à travers la membrane pour gagner le milieu extérieur. Leur structure est identique à celle de la céphaline en suspension aqueuse. La libération précoce de ces micelles pourrait représenter la forme active des phospholipides apportés par les plaquettes à la coagulation. Ces faits n'ont cependant pas encore reçu confirmation.

c) Il est également possible que l'activité coagulante des plaquettes soit liée à la membrane plaquettaire elle-même.

TECHNIQUES DE DOSAGE DU FACTEUR PLAQUETTAIRE 3

On peut envisager de doser le facteur plaquettaire 3 par deux grands groupes de méthodes :

- biologiques qui reflètent l'activité prothromboplastique des plaquettes,

- biochimiques qui rendent compte de la quantité de phospho - lipides contenue dans les plaquettes .

A. - Les techniques biologiques paraissent les plus intéressantes et les plus utilisables en pathologie.

Elles comprennent :

- la thromboplastinoformation de BIGGS et DOUGLAS dont dérivent nombre de techniques utilisées.

- la thrombinoformation , mesurée par la consommation de prothrombine ou la génération de thrombine.

- un troisième type de technique fait intervenir des éléments non physiologiques, à savoir, une thromboplastine incomplète extraite du venin de vipère Russell ou Stypven ; des méthodes physiques de "libération du facteur plaquettaire 3" tels que le choc osmotique, la congélation-décongélation, les ultra-sons ; une substance capable de "libérer" partiellement le facteur plaquettaire 3 comme le kaolin, le test d'activité plaquettaire du sérum sera étudié séparément.

Quelle que soit la technique utilisée, il est indispensable que les plaquettes soient la seule variable du système coagulant ; les quantités de matériel plaquettaire doivent être comparables chez le témoin et le sujet à tester.

1) TEST DE GENERATION DE THROMBOPLASTINE (T.G.T.)

Décrit par BIGGS et DOUGLAS en 1953 (8), le principe de ce test est de mesurer sur un substrat apportant la prothrombine et le fibrinogène en quantité constante (plasma normal déplaquettisé), la thromboplastine formée dans une "mixture d'incubation" contenant tous les éléments nécessaires à la thromboplastinoformation endogène :

- Plasma adsorbé par le sulfate de baryum ou l'hydroxyde d'alumine apportant les facteurs V, VIII, en partie, le XI et le XII.

- Sérum provenant de sang recueilli sur thromboplastine, apportant les facteurs IX, X, en partie, le XI et le XII.

- Une source de phospholipides sous la forme de plaquettes lavées deux fois en eau physiologique et remise en suspension dans un volume d'eau physiologique égal au tiers du volume de plasma riche en plaquettes initial.

- Calcium .

Technique

La mixture d'incubation est obtenue en mélangeant dans un tube à hémolyse, au bain-marie à 37° C, des volumes égaux (0,3 ml) de chacun des 4 réactifs. Chaque minute après recalcification, 0,1 ml de la mixture est prélevé et ajouté à un mélange extemporané, à parties égales (0,1 ml) de plasma substrat et de calcium.

Les temps de coagulation mesurés permettent de construire une courbe de génération de thromboplastine. Il est possible d'étudier le facteur plaquettaire 3 par cette méthode en comparant les courbes obtenues avec des réactifs dont la seule variable est la suspension plaquettaire témoin ou à tester à la même concentration.

De très nombreux auteurs ont utilisé cette technique simple avec des modifications de détail variées (11, 90) . La principale difficulté réside en la standardisation des suspensions plaquettaires après ces nombreuses manipulations.

2) THROMBINOFORMATION

a) Consommation de Prothrombine

La méthode initialement décrite par QUICK en 1947 (80) a été modifiée par J.P. SOULIER (86) : technique en deux temps et par OWREN (73) : technique en un temps.

Elle consiste à mesurer la quantité de prothrombine résiduelle dans le sérum après coagulation du sang. Au cours de la coagulation normale, la prothrombine est entièrement transformée en thrombine sous l'influence de la thromboplastine active endogène plasmatique, et on ne la retrouve qu'à l'état de trace dans le sérum. Si la formation de thromboplastine endogène est anormale, la quantité de prothrombine résiduelle dans le sérum sera d'autant plus importante que le trouble de la thrombo - plastinoformation est plus marqué .

La méthode en deux temps consiste en une préincubation du sérum et de thromboplastine tissulaire (0,1 ml) durant une minute au bain-marie à 37° C, permettant la transformation de la prothrombine résiduelle en thrombine. Dans un second temps, l'activité de cette thrombine est testée en mesurant le temps de coagulation de 0,2 ml d'une suspension de fibrinogène ajouté au système. Les temps obtenus sont d'autant plus courts que le trouble de la thromboplastinoformation est plus marqué.

La méthode en un temps est la mesure directe de la quantité de prothrombine présente dans le sérum et reprend le principe du dosage différentiel des éléments du complexe prothrombique. Le sérum à tester dilué est ajouté à un système artificiel contenant en excès tous les facteurs à l'exception du facteur II (prothrombine).

En réalité, il suffit d'un apport de facteur V sous la forme de plasma adsorbé par le sulfate de baryum. Au bain-marie à 37° C on introduit dans un tube à hémolyse :

- 0,1 ml de plasma adsorbé (ou 0,1 ml du mélange 2/3 de plasma adsorbé + 1/3 de sérum normal)
- 0,1 ml de thromboplastine tissulaire
- 0,1 ml de calcium 0,025 M

Le temps nécessaire à 0,1 ml de sérum dilué au 1/10 pour permettre la coagulation de ce système est fonction de la quantité de prothrombine qu'il contient. Les temps obtenus sont d'autant plus courts (excès de prothrombine) que le trouble de la thromboplastinoformation est plus marqué.

La mesure est faite sur le sérum issu du sang recueilli dans deux tubes à hémolyse et laissé quatre heures au bain-marie. Il est possible d'adapter cette technique à une mesure plus spécifique du facteur plaquettaire 3 en utilisant un plasma riche en plaquettes .

b) Génération de thrombine

Décrit par PITNEY et DACIE en 1953 (78), ce test permet une étude plus dynamique de la coagulation intrinsèque. Son principe, très simple, consiste en l'étude de la formation de la thrombine pendant la coagulation du sang ou du plasma citraté, recalcifié.

La méthode utilisant le plasma est facilement applicable à l'étude de l'activité coagulante des plaquettes. Dans un tube à hémolyse, au bain-marie à 37° C, on incube une mixture comprenant 1,6 ml de plasma riche en plaquettes et 0,4 ml de solution calcique. La mesure de la thrombine formée est faite chaque minute en ajoutant 0,1 ml de la mixture à 0,2 ml d'un substrat apportant du fibrinogène (plasma déplaquettisé , plasma adsorbé ou solution de fibrinogène). Les temps se raccourcissent

progressivement témoignant d'une génération de thrombine qui, après un pic d'activité, se réduit plus ou moins rapidement, particulièrement sous l'effet de l'antithrombine progressive du sérum. Les courbes du témoin et du sujet à tester sont toujours comparées à chiffre égal de plaquettes.

3) TECHNIQUES FAISANT INTERVENIR DES ELEMENTS NON PHYSIOLOGIQUES

a) Temps de Stypven (43, 19)

Le venin de vipère Russell ou Stypven est une thromboplastine incomplète nécessitant pour son action maximum la présence de prothrombine, de proaccélérine, de facteur Stuart et de facteur plaquettaire 3.

En utilisant des plasmas contenant des chiffres équivalents de plaquettes (ce qui élimine les anomalies dûes aux thrombopénies), il est possible d'adapter ce test à l'étude de l'activité coagulante des plaquettes.

Le Stypven dilué au 1/10.000 dans sa préparation commerciale, est dilué 30 fois dans du tampon et est conservé dans la glace pendant la durée du test.

La technique est très simple et consiste à mesurer le temps de recalcification d'un système comprenant (temps de Stypven calcique) :

- 0,1 ml de plasma riche en plaquettes citraté,
- 0,1 ml de Stypven au 1/300.000,
- 0,1 ml de tampon,
- 0,1 ml de Cl_2 Ca .

mélangés dans un tube à hémolyse, au bain-marie à 37° C . Un allongement des temps obtenus peut traduire un déficit en facteur X, V, II ou en facteur plaquettaire 3. Il est facile d'éliminer cette dernière hypothèse en remplaçant les 0,1 ml de tampon par 0,1 ml d'une solution de céphaline (temps de Stypven céphaline). Une correction totale des temps obtenus chez le sujet à

tester par rapport au témoin, permet d'attribuer l'anomalie observée dans le temps de Stypven calcique à un déficit plaquettaire.

b) Un certain nombre d'auteurs ont utilisé des moyens physiques énergiques, capables de rompre les plaquettes, pour étudier, par des méthodes biologiques, l'activité coagulante totale des plaquettes.

- ULUTIN (93, 94) utilise le choc osmotique. Les plaquettes sont mises à incuber en eau distillée, 30 minutes, au bain-marie à 37° C . Le facteur plaquettaire 3 ainsi libéré est étudié par le T.G.T. .

- Après QUICK (79), la technique de lyse des plaquettes par congélation-décongélation a été largement employée. Le plus souvent, les plaquettes sont congelées rapidement dans un mélange carboglace-alcool, décongelées au bain-marie à 37° C. Cette opération est répétée trois fois.

- FONIO (33) lyse les plaquettes par les ultrasons (800 kilo - cycles, 5 watts, pendant 1 minute 1/2). De très nombreux auteurs ont utilisé cette méthode, parfois associée à la précédente, pour obtenir une disparition à peu près complète des structures plaquettaires.

c) Plus récemment, la disponibilité du facteur plaquettaire 3 en présence de particules de kaolin a été particulièrement étudié (39, 91). Cette substance est connue depuis longtemps en hémostase pour ses propriétés adsorbantes et sa capacité à activer le facteur XII.

La libération des phospholipides plaquettaires nécessite une activation des plaquettes. Dans les techniques classiques, cette activation ne paraissait pas suffisamment standardisée pour être aisément interprétable et les procédés physiques trop drastiques pour rendre compte d'un phénomène physiologique. Ces auteurs ont pensé pouvoir obtenir à l'aide du kaolin une activation modérée et surtout standardisée des plaquettes.

- HARDISTY (39) propose de mesurer le temps de recalcification d'un plasma riche en plaquettes citraté mis à incuber 20 minutes au bain-marie à 37° C en présence de kaolin en suspension dans du tampon à la concentration de 5 mg/ml .

Les mixtures suivantes sont réalisées :

1. - 0,1 ml PPP témoin + 0,1 ml PRP témoin + 0,2 ml kaolin
2. - 0,1 ml PPP à tester + 0,1 ml PRP témoin + 0,2 ml kaolin
3. - 0,1 ml PPP témoin + 0,1 ml PRP à tester + 0,2 ml kaolin
4. - 0,1 ml PPP à tester + 0,1 ml PRP à tester + 0,2 ml kaolin

A la vingtième minute, le temps nécessaire à la coagulation de chaque système est déterminé.

Si les PRP contiennent un nombre équivalent de plaquettes, un allongement des temps entre les tubes 1 et 4 traduit une anomalie globale de la coagulation ; associé à un allongement entre les tubes 1 et 3, une anomalie plaquettaire.

- SPAET (91) utilise une technique associant le kaolin (lavé et suspendu en tampon à la concentration de 5%) et le Stypven (10 µg/ml).

Une mixture comprenant 0,9 ml de PRP citraté intact et 0,1 ml de suspension de kaolin est mise à incuber au bain-marie à 37° C, après une agitation modérée. Le test consiste à mesurer à des intervalles convenables (1, 5, 10, 15 et 20ème minute), le temps de coagulation du système :

- 0,1 ml de PRP incubé
- 0,1 ml de Stypven dilué
- 0,1 ml de Cl_2 Ca .

La présence de Stypven réduit considérablement le nombre des variables. Ce sont les facteurs X, V et le facteur plaquettaire 3 . Toutes ces mesures sont effectuées comparativement à un témoin ayant le même chiffre de plaquettes.

4) TEST D'ACTIVITE PLAQUETTAIRE DU SERUM

Mis au point par D. ALAGILLE et J.P. SOULIER (2) à la suite des travaux d' O'BRIEN (71), ce test explore l'activité coagulante des phospholipides libérés 4 heures après la coagulation du sang total. Ils sont alors sous forme soluble, non sédimentable .

Le principe est d'apprécier à des intervalles convenables après recalcification, la consommation de prothrombine dans une mixture de plasma normal déplaquettisé substrat et de sérum à tester.

Un mélange de plasma substrat déplaquettisé (0,15 ml) et de sérum à tester (0,10 ml) est incubé dans un tube à hémolyse pendant une minute au bain-marie à 37° C, puis recalcifié (0,15 ml Cl_2 Ca). Après élimination du caillot, à la quatrième et sixième minute, 0,1 ml de mixture diluée au 1/10 est ajouté au système classique de dosage différentiel de la prothrombine (87). Le temps de coagulation est d'autant plus court que la mixture est plus riche en prothrombine et, partant , le sérum plus pauvre en activité coagulante. La différence entre les temps trouvés à la sixième et la quatrième minute (exprimée en secondes) représente l'activité plaquettaire du sérum.

B. - METHODES BIOCHIMIQUES

MARCUS (64) extrait les phospholipides des plaquettes à tester et compare (à concentration protéique égale) leur activité coagulante à celle des extraits témoin dans un système de génération de thromboplastine.

A partir de cette fraction phospholipidique totale, les différents constituants sont séparés par chromatographie sur papier en acide silicique et comparés aux fractions témoin obtenues dans des conditions identiques .

LES MALADIES PLAQUETTAIRES

La classification généralement admise des thrombopathies distingue :

A) LES THROMBOPATHIES CONGENITALES

1. Thrombasthénie ou Maladie de Glanzmann-Naegeli

2. Thrombopathies avec déficit en facteur plaquettaire 3

   - Dystrophie thrombocytaire hémorragipare,
   - Syndrome de Willebrand-Jürgens

B) LES THROMBOPATHIES ACQUISES

1. Avec chiffre de plaquettes normal ou subnormal

   - Infections
   - Urémie
   - Myelosclérose

2. Avec chiffre de plaquettes normal ou souvent augmenté

   - Leucémie myéloïde chronique

A. THROMBOPATHIES CONGENITALES

1) Thrombasthénie

Décrite par GLANZMANN en 1918, cette affection, transmise selon le mode autosomal récessif, est définie par un allongement du temps de saignement avec absence de rétraction du caillot.

Très tôt dans l'enfance, apparaissent des hémorragies cutanées et muqueuses, spontanées ou provoquées par un traumatisme minime. Les épistaxis dominent la clinique par leur présence quasi-constante, leur abondance, leur répétition. Les premières règles, chez la fille, sont souvent très hémorragiques et des accidents graves peuvent survenir après extraction dentaire ou intervention chirurgicale. La gravité du syndrome hémorragique a tendance à s'estomper avec l'âge .

Les critères indispensables au diagnostic sont : le chiffre normal de plaquettes, une thrombopénie modérée ne se voit qu'en présence d'iso-anticorps antiplaquettes, un allongement du temps de saignement parfois difficile à affirmer, une absence ou une diminution importante de la rétraction du caillot.

L'étude des fonctions plaquettaires révèle une absence totale d'agrégation observée :

- sur le frottis sanguin, les plaquettes apparaissent isolées
- en microscopie de phase, il n'y a pas d'agrégation spontanée
- par les méthodes macroscopique ou photométrique, il n'existe aucune agrégation en présence de fortes concentrations d'ADP extrinsèque. L'adhésion des plaquettes sur lame et la rétention des plaquettes sur colonne de billes de verre (test de Salzman) sont nettement perturbées, mais l'adhésion aux fibres de collagène est normale. La libération d'ADP plaquettaire par la thrombine et le collagène s'effectue normalement, mais cet ADP est incapable d'agréger les plaquettes thrombasthéniques.

Plusieurs anomalies des constituants plaquettaires sont rapportées :

- aspect anormal des granules au microscope électronique (37),
- déficit enzymatique en pyruvate-kinase, glyceraldehyde deshydro - génase, Mg^{++} ATPase (37, 22, 103) .
- déficit en ATP ou en ADP avec modification du rapport $\frac{ATP}{ADP}$
- diminution importante du fibrinogène intra-plaquettaire alors que le fibrinogène plasmatique adsorbé à la surface des plaquettes est normal (22, 103).

Aucune de ces anomalies n'est constante ou spécifique.

Le facteur plaquettaire 3, mesuré par le T.G.T. est comparable, parfois même supérieur au témoin . Les phospholipides plaquet - taires ont une composition et une activité coagulante normale . Cependant, les techniques utilisant le kaolin (26, 38) ont mis en évidence une dimi - nution de la disponibilité du facteur plaquettaire 3 probablement liée à l'absence d'agrégation plaquettaire.

La consommation de prothrombine, tous les facteurs plasmatiques de coagulation sont normaux.

La pathogénie de la thrombasthénie n'est pas encore bien établie. Cependant, la diminution du fibrinogène intraplaquettaire est fréquente et dans ce groupe on note en microscopie électronique la présence de granulations denses de taille anormale en petit nombre et de gouttelettes lipidiques. Dans un autre groupe, il existe un déficit enzymatique et en microscopie électronique il n'existe pas de stéatose mais des granulations denses de taille anormale en grand nombre (FALCAO, PROBST, GAUTIER, VAINER, MICHEL et CAEN) .

2) Au contraire de la thrombasthénie, la dystrophie thrombocytaire hémorragipare, le syndrome de Willebrand- Jürgens sont des thrombopathies congénitales avec consommation de prothrombine et T.G.T. anormaux, révélant un déficit en facteur plaquettaire 3.

- Dystrophie thrombocytaire hémorragipare.

Décrite en 1948 par Jean BERNARD et J.P. SOULIER (6) cette affection à transmission récessive autosomique est remarquable par le gigantisme des plaquettes associé à des troubles de la coagulation intrinsèque.

Le syndrome hémorragique apparait très tôt dans l'enfance. Ce sont des hémorragies cutanées et muqueuses, répétées, le plus souvent spontanées, pouvant être fatales dans les premières années de la vie. Les hémarthroses sont exceptionnelles. Ces accidents ont tendance à s'atténuer avec l'âge .

Le syndrome biologique est caractérisé par :

- un temps de saignement constamment allongé,
- un chiffre de plaquettes normal au début de la maladie évoluant généralement vers une thrombopénie plus ou moins accusée,
- une dysmorphie plaquettaire évidente.

La taille est toujours très augmentée, comprise entre 5 et 30 µ suivant les conditions d'observation. Le chronomère dense et central peut réaliser un aspect pseudo-lymphocytaire. Ces altérations atteignent la majorité des plaquettes et sont permanentes. La microscopie électronique n'a pas révélé d'anomalie morphologique spécifique.

- des fonctions plaquettaires peu perturbées.

L'adhésion au verre, l'agrégation spontanée, la métamorphose visqueuse, la rétraction du caillot sont normales.

L'adhésion des plaquettes à la brèche vasculaire parait diminuée.

L'agrégation à l'ADP extrinsèque, en présence de collagène ou de thrombine, est plus rapide que la normale. Par contre, la libération d'ADP intrinsèque induit par la thrombine ou le collagène semble diminuée, mais sa consommation très rapide pourrait expliquer ce déficit apparent.

- une diminution constante de la consommation de prothrombine traduisant une thromboplastinoformation perturbée.

Tous les facteurs plasmatiques de coagulation sont normaux, et un déficit en facteur plaquettaire 3 a été mis en évidence par le T.G.T., la génération de thrombine, l'activité plaquettaire du sérum, le temps de Stypven (7, 3). Les différentes méthodes de lyse plaquettaire seraient incapables de corriger ce déficit.

Aucune explication pathogénique n'est actuellement donnée à la dystrophie thrombocytaire. Les études enzymatiques n'ont pas montré d'anomalie évidente en dehors d'un rendement métabolique insuffisant, compte tenu de la taille des plaquettes (GROSS et LOHR).

- Syndrome de Willebrand-Jürgens

Les auteurs allemands (JURGENS, GROSS, MARX) ont insisté sur l'individualité d'un syndrome congénital associant un allongement du temps de saignement avec chiffre et morphologie plaquettaire normaux à une consommation de prothrombine perturbée.

Sa clinique est très proche de celle de la dystrophie thrombocytaire; le plus souvent, les accidents hémorragiques sont moins graves.

L'individualité de ce syndrome est surtout biologique. L'allongement du temps de saignement est modéré, parfois subnormal. Le chiffre des plaquettes, leur taille et leur aspect en microscopie optique

paraissent normaux. SCHULZ (82) a montré des granules plaquettaires anormaux au microscope électronique.

L'index d'adhésivité plaquettaire à la brèche vasculaire est diminué mais l'adhésion au verre, aux fibres de collagène est normale.

Une hyperagrégabilité en présence d'ADP extrinsèque, une libération d'ADP intrinsèque diminuée avec consommation accélérée est observée ici comme dans la dystrophie thrombocytaire.

Les tests généraux de la coagulation intrinsèque sont perturbés de façon inégale (57, 89, 95). La consommation de prothrombine est le plus souvent modérément diminuée et le pourcentage résiduel dans le sérum peu élevé. Le test de génération de la thromboplastine est presque constamment anormal. Après congélation-décongélation, le facteur plaquettaire 3 (mesuré par le T.G.T.) est encore très diminué, normal après ultrasons (57). Le contenu plaquettaire en facteur 3 serait donc normal et sa disponibilité au cours de la coagulation, insuffisante.

B) THROMBOPATHIES ACQUISES

L'apparition d'un syndrome hémorragique est fréquent au cours de maladies aussi variées que les infections, l'insuffisance rénale, les myélomes et les macro-globulinémies, les leucémies. La pathogénie de ces accidents n'est pas toujours connue et souvent discutée.

1) Ainsi, une anomalie de la coagulation, une fragilité vasculaire, une anomalie fonctionnelle plaquettaire ont tour à tour été invoquées pour expliquer la tendance hémorragique des insuffisants rénaux. Récemment, CAHALANE et coll. (25) rapportaient un déficit de la thrombo - plastinoformation dûe à une diminution du facteur plaquettaire 3 . ALTSCHULER (5) au contraire obtient des phospholipides plaquettaires et une activité coagulante normale.

2) L'étude de l'hémostase chez les malades atteints de leucémie myéloïde chronique non traitée, a révélé plusieurs anomalies.

Le temps de saignement est le plus souvent normal, parfois modérément allongé. Une thrombocytose est assez fréquente et il existe une macro-thrombocytose souvent discrète. Dans la plupart des cas étudiés par CAEN (24), les plaquettes s'étalent lentement au verre, l'agrégation spontanée est diminuée et retardée. L'agrégation de l'ADP est normale tandis qu'à l'adrénaline, elle est ralentie; l'activité agrégante du sérum parait diminuée. Il n'y a pas d'anomalie évidente des constituants plaquettaires, en particulier, des nucléotides. Selon les auteurs, le facteur plaquettaire 3 est diminué (25) ou normal (76).

Il semble bien que dans la leucémie myéloïde chronique il existe de réelles anomalies des fonctions plaquettaires dont l'origine reste inconnue (mégacaryocytopathie ou désordre plasmatique enzymatique responsable du gigantisme plaquettaire).

OBSERVATIONS

OBSERVATION 1 - GAH .... Nicole, âgée de 26 ans.

Il s'agit d'une forme grave de dystrophie thrombocytaire hémorragipare (D.T.H.) ayant débuté dans l'enfance par de fréquentes ecchymoses, des gingivorragies, des hémorragies à la chute des dents de lait.

Mais c'est surtout à la puberté que les règles par leur abondance et leur prolongation ont nécessité de très nombreuses transfusions et des traitements locaux (tamponnements). Seul, un traitement endocrinologique (Testostérone) a permis de réduire l'intensité du syndrome hémorragique et d'atteindre un certain équilibre.

En 1964, la splénectomie est décidée car la malade est devenue progressivement thrombopénique ; la moelle est riche en mégacaryocytes et l'examen isotopique révèle une sequestration plaquettaire à prédominance splénique. Précédée et suivie de corticothérapie (30 mg/J pendant 10 jours) l'intervention est peu hémorragique. Le chiffre des plaquettes s'élève progressivement à 195.000/mm^3 mais retombe ensuite rapidement à 90.000 .

L'étude familiale révèle que deux enfants de cette fratrie de sept sont morts à l'âge de 4 ans d'hémorragie digestive. Tous les autres sujets sont cliniquement normaux. Les parents ne sont pas consan - guins.

OBSERVATION 2 - BOE .... Daniel, âgé de 12 ans.

Il s'agit d'une D.T.H. d'expression clinique modérée ayant débuté dès les premiers pas sous forme d'ecchymoses. Des épistaxis de fréquence mensuelle sont apparues à l'âge de 2 ans et demi. Elles sont abondantes, bilatérales, nécessitant de nombreuses transfusions. Il n'y a aucun antécédent familial connu.

OBSERVATION 3 - MON .... Dominique, âgé de 5 ans.

Il s'agit d'un syndrome hémorragique grave ayant débuté dès l'âge de 18 mois par des épistaxis et des hémorragies digestives. Dominique est le septième enfant d'une fratrie de 9 dont 6 sont morts durant l'enfance d'hémorragie. Les deux soeurs actuellement vivantes sont en bonne santé, mais n'ont pas été examinées.

OBSERVATION 4 - BLA .... Christine, âgée de 9 ans . Thrombasthénie.

Les accidents hémorragiques ont débuté dès la naissance, après un accouchement normal au terme de 8 mois; on note dès la troisième heure un purpura pétéchial généralisé qui disparait vers le 8ème jour. En outre, dès les premiers mois de la vie, des hémorragies intestinales de sang rouge ont entrainé, par leur répétition, une anémie importante.

A l'âge de 6 mois apparaissent les premières épistaxis, importantes, durables, abondantes qui, du fait de leur répétition, ont nécessité de nombreuses transfusions. Fréquemment, on note des poussées de purpura pétéchial ou ecchymotique. Il est parfois spontané mais en règle générale, provoqué par le moindre traumatisme.

L'enquête génétique a montré l'absence d'antécédents hémorragiques, de modifications des tests d'hémostase chez les ascendants. Mais il existe une consanguinité : les grands parents sont sousins germains. Une soeur plus jeune est atteinte de la même affection.

OBSERVATION 5 - HEI .... Berndt, âgé de 12 ans. Thrombasthénie.

Les accidents hémorragiques apparaissent dès l'âge de 15 mois sous forme d'une hémorragie nasale post-traumatique qui se prolonge durant 3 jours. A 21 mois, on note une hémorragie du frein de la langue, abondante, prolongée, nécessitant trois transfusions. Plus tard, apparaissent de très nombreuses épistaxis, des ecchymoses, des gingivorragies, des hémorragies prolongées après des coupures, parfois un purpura pétéchial.

A l'âge de 5 ans survient une hémorragie digestive au cours de laquelle une hématémèse associée à un melaena entraine une anémie importante nécessitant des transfusions. L'enfant fait des hémarthroses, en particulier, à la cheville droite.

On ne note aucun antécédent hémorragique familial et il n'existe pas de consanguinité.

OBSERVATION 6 - LUC.... Guillaume, âgé de 39 ans. Thrombasthénie.

Aucun signe hémorragique patent en dehors d'ecchymoses provoquées par de petits traumatismes n'est noté jusqu'en 1955 où une hémorragie suivant l'ablation d'un polype vésical, révèlé par une hématurie, fait pratiquer un examen hématologique. L'aspect isolé des plaquettes sur le frottis sanguin, l'absence de rétraction du caillot, le chiffre normal de plaquettes permet de faire le diagnostic.

L'évolution est calme, sans accident majeur, pendant dix ans. En Septembre 1966, une hémorragie digestive, révélée par des hématémèses et un mélaena, entraine une anémie importante. Une vingtaine de transfusions de sang frais associées à une corticothérapie modérée(30 mg/j) permettent de corriger ces désordres en 15 jours.

Il n'y a aucun antécédent familial connu.

OBSERVATION 7 - LEB .... Martine, âgée de 8 ans. Allongement isolé du temps de saignement.

Cette enfant nous a été adressée à la suite d'une amygdalectomie particulièrement hémorragique ayant nécessité plusieurs transfusions et d'une avulsion dentaire suivie d'une hémorragie requerant également une transfusion.

Nous n'avons trouvé aucun antécédent hémorragique chez cette petite fille et tous les membres de sa famille sont cliniquement normaux.

OBSERVATION 8 - COL .... Bruce, âgé de 6 ans. Allongement isolé du temps de saignement.

Lors d'un examen systématique, on découvre chez cet enfant un allongement du temps de saignement. Aucun antécédent hémorragique personnel ni familial n'a été trouvé.

OBSERVATION 9 - JOL .... Martine, âgée de 18 ans.

Dès la première enfance, on note une tendance hémorragique faite d'ecchymoses fréquentes dès les premiers pas. Vers l'âge de 6 ans apparaissent des épistaxis. Depuis la puberté, les règles sont normales.

En 1965, la découverte fortuite d'un temps de saignement à 30 minutes et d'un taux de facteur VIII à 75% fait porter le diagnostic de maladie de Willebrand. Ce diagnostic semble devoir être refusé car deux dosages successifs de facteur VIII ont révélé des taux supérieurs à 80% .

En 1967, de nouveaux examens sont pratiqués avant l'extraction d'une dent de sagesse incluse.

L'étude familiale montre que la mère, seule, présente des troubles hémorragiques : ecchymoses, épistaxis, hématomes et a eu une hémoptysie de faible abondance.

OBSERVATION 10 - BLA .... Thérèse, âgée de 40 ans.

Les troubles hémorragiques ont débuté dès la première enfance sous forme d'ecchymoses, d'hématomes, de saignement très prolongé post-traumatique. Dès la puberté, les règles sont très prolongées; deux grossesses sont cependant menées à terme, mais les accouchements sont hémorragiques.

Les oncles et les tantes paternels, un frère de la malade, présentent des troubles hémorragiques; ses deux enfants sont cliniquement normaux.

OBSERVATION 11 - MAI .... Jacqueline, âgée de 30 ans.

Allongement isolé du temps de saignement.

Cette malade nous a été adressée à la suite d'une hémorragie abondante après avulsion dentaire, nécessitant une transfusion.

Aucun antécédent hémorragique personnel ni familial n'a été trouvé.

OBSERVATION 12 - BER .... Claudine, âgée de 68 ans.

Leucémie myéloïde chronique.

En 1965, après un épisode d'asthénie isolé , un examen hématologique révèle une anémie modérée, une hyperleucocytose à 60.000 / mm3 avec 70% de granulocytes mûrs et une myélémie à 20% , 650.000 plaquettes par mm3 . L'hyperplasie granuleuse de la moelle confirme le diagnostic de L.M.C. Un traitement par le Busulfan (6 mg/j) est entrepris, la posologie est réduite à 2 mg/j en 1966 . Devant une évolution calme, en particulier, sans aucune complication hémorragique, le traitement est suspendu au début de 1967 .

OBSERVATION 13 - PET ..., Sylvaine, âgée de 60 ans.

Splénomégalie myéloïde.

Trois ans après l'apparition d'un syndrome hémorragique fait d'ecchymoses spontanées et d'épistaxis, la découverte d'une volumineuse splénomégalie conduit à entreprendre en 1962 une exploration héma - tologique. L'anémie est modérée, la leucocytose normale avec une myélémie importante, la thrombopénie modérée. Le myélogramme peu riche avec une dimi - nution nette de lignée granuleuse révèle une hémoblastose à 12% . Le spléno - gramme montre 8% de lymphocytes, 10% d'hémoblastes, 34% d'éléments de la lignée granuleuse, 48% d'érythroblastes et 4 mégacaryocytes pour 10.000 éléments.

La fibrose modérée de la moelle est compatible avec le diagnostic de splénomégalie myélo"ide.

L'évolution est dominée par les incidents hémorragiques fréquents; les épistaxis fréquentes, abondantes ont nécessité plusieurs transfusions.

M E T H O D E S

I) ISOLEMENT DU PLASMA

Le sang est prélevé en matériel siliconé sur citrate de soude à 3,8 % (une partie pour 9 parties de sang).

Le plasma riche en plaquettes (P R P) est obtenu par centrifugation immédiate à 4° C à 1.500 tours/minute (275 g) pendant 5 minutes; le plasma pauvre en plaquettes (P P P) est obtenu par nouvelle centrifugation du P R P à 4.000 tours/minute (1.600 g).

II) ETUDE DES FONCTIONS PLAQUETTAIRES

1) Temps de saignement.

- Méthode de **DUKE** a l'oreille (29). Normale : inférieure ou égale à 4 minutes

- Méthode d'**IVY** à l'avant-bras(55). Normale : inférieure ou égale à 8 minutes.

2) Adhésivité des plaquettes.

- in vivo : test de BORCHGREVINK (12), le nombre de plaquettes adhésives à la brèche vasculaire est exprimé en pourcentage du nombre de plaquettes contenues dans le sang capillaire. Normale : 20 à 40% .

- in vitro : le test de SALZMAN (81) mesure l'adhésivité (rétention) des plaquettes du sang total après passage sur une colonne de billes de verre. Le temps de passage du sang sur la colonne est constant (40 à 45 secondes), le volume recueilli doit être de 5 à 7 ml. Le

chiffre de plaquettes de référence est compté sur le sang veineux prélevé au même point de piqûre et recueilli sans passage sur billes de verre. Le pourcentage normal de plaquettes adhésives est compris entre 20 et 50 pour cent.

3) La numération des plaquettes est faite au microscope à contraste de phase selon la méthode de PIETTE (77).

4) Etude morphologique des plaquettes au microscope à contraste de phase (Zeiss W.L.).

5) Rétraction du caillot sur sang total dans 2 tubes à hémolyse rincés au sérum physiologique tamponné (pH 7,3). La lecture se fait après 4 heures au bain-marie à 37° C.

6) Agrégation plaquettaire macroscopique à l'ADP (20). C'est la mesure du temps d'apparition des agrégats d'un plasma citraté riche en plaquettes en présence d'ADP extrinsèque. Nous n'avons retenu que les temps obtenus avec 2 γ /ml d'ADP. Les temps obtenus avec les P R P témoins (250.000 plaquettes/mm3) varient de 15 à 18 secondes.

7) Agrégation plaquettaire photométrique en présence d'ADP avec agitation continue (85).

Le 100 du galvanomètre est ajusté sur la longeur d'onde de 602 mμ ; le zéro est indiqué par le PPP . Le test consiste en la mesure, au cours du temps, des variations de la densité optique (d.o.) en présence d'ADP (2 γ /ml). Nous n'avons retenu que la diminution maximum de la d.o. ; elle est fonction du nombre et de l'agrégation des plaquettes contenues dans le PRP.

Les chiffres normaux de diminution maximum de la d.o. sont compris entre 50 et 75% avec un PRP témoin contenant 200.000 plaquettes par millimètre cube.

8) Activité agrégante du sérum (21).

Ce test permet de mesurer la libération de l'ADP intrinsèque d'un plasma riche en plaquettes en présence de thrombine.

A 0,9 ml de PRP on ajoute, au bain-marie à 37° C, 0,1 ml de thrombine. Le caillot de fibrine est retiré, à l'aide d'une pipette Pasteur, 4 minutes après adjonction de thrombine. On ajoute 0,1 ml de ce plasma défibriné à 0,2 ml de P R P substrat . L'activité agrégante du plasma défibriné est mesurée par le temps d'agrégation macroscopique des plaquettes du plasma riche en plaquettes normal. Nous n'avons retenu que les temps mesurés à la 30ème minute après adjonction de thrombine.

Les chiffres obtenus varient entre 10 et 15 secondes pour un plasma contenant 200.000 plaquettes par mm3 .

9) Temps de Stypven (19).

Le Stypven est utilisé dilué au 1/300.000 et la dilution conservée dans la glace toute la durée des tests. Le Stypven calcique, chez les sujets normaux donne un temps compris entre 25 et 35 secondes; le Stypven céphaline un temps compris entre 10 et 18 secondes.

10) Test de HARDISTY.

La technique du temps de recalcification du P R P en présence de kaolin est décrite précédemment (page 26). Les temps obtenus avec les témoins est de l'ordre de 35 à 55 secondes.

11) Test de SPAET.

Cette technique mesure la libération du facteur plaquettaire 3 en présence de kaolin par le temps de Stypven. Nous l'avons utilisée selon la méthode de l'auteur décrite précédemment (page 26).

12) Test de génération de thromboplastine.

Nous avons utilisé la méthode originale des auteurs (8) avec les modifications suivantes : le plasma citraté adsorbé par l'hydroxyde d'alumine est remplacé par un plasma oxalaté adsorbé par SO_4 Ba (10%) ; le sérum provient de sang recueilli sur thromboplastine (0,1 pour 5 ml de sang); le chiffre de plaquettes lavées en suspension est de 100.000 / mm3.

13) Thrombocélastogramme

Méthode originale de HARTERT (41), les valeurs normales pour un PRP à 200.000 ou 250.000 plaquettes/mm3 sont de l'ordre de :

r = 15 mm, K = 12 mm, m.a. = 58-62 mm .

14) Méthodes que nous avons utilisé dans le présent travail :

Nous avons utilisé deux méthodes qui ont été comparées dans des conditions de travail rigoureusement identiques en présence d'un nombre de plaquettes constant (20.000 ou 60.000 / mm3 concentration finale). L'une d'elles mesure la prothrombine résiduelle, l'autre la génération de thrombine.

MATERIEL ET METHODES

Dans les deux techniques, nous avons utilisé une suspension plaquettaire (SP) : 50 ml de sang sont recueillis dans un tube en plastic sur une solution hypercitratée (acide citrique 0,13 M, citrate de soude 0,126 M, dextrose 2%), une partie pour neuf parties de sang. Le sang est aussitôt centrifugé pendant 5 minutes à 1.500 tours par minute (200 g) à 4° C; le plasma riche en plaquettes est décanté puis centrifugé pendant 15 minutes à 3.500 tours par minute (1.400 g) en tubes siliconés entre 8 et 10° C . Le culot plaquettaire obtenu est doucement remis en suspension dans 1 ml de plasma pauvre autologue hypercitraté à l'aide du Whirlimixer °, les plaquettes sont numérées selon PIETTE (77)la dilution étant faite au 1/500 ème; la suspension est ramenée au chiffre de 10^6 plaquettes par mm3 en la diluant dans

° Fisons scientific apparatus Ltd Longhborough Leicestershire (England)

la quantité nécessaire de plasma pauvre en plaquettes autologue hypercitraté. Une nouvelle numération est effectuée afin de contrôler la dilution. Pendant la durée des tests, la suspension plaquettaire est conservée en tubes sili - conés entre 15 et 20° C.

DOSAGE DE LA PROTHROMBINE RESIDUELLE

Principe

On mesure la prothrombine résiduelle à la 30ème minute après recalcification d'un plasma pauvre en plaquettes (PPP) substrat et de plaquettes en nombre variable (20 ou 60.000/mm^3 final).

Réactif

PPP substrat : 500 ml de sang de trois donneurs du même groupe sont prélevés en verrerie siliconée sur la même solution hyper - citratée et centrifugés 15 minutes à 3.500 tours par minute (1.400 g) entre 8 et 10° C et 4 fois pendant 1 heure à 25.000 tours par minute (30.000 g) à + 4° C. Après chaque centrifugation, le surnageant est décanté. Le PPP ainsi obtenu contient moins de 100 plaquettes par mm3 ; il est conservé par fraction de 5 ml en tubes plastic à - 20° C, n'est décongelé que le jour de l'expérience et jamais réutilisé après décongélation.

Les réactifs du dosage de prothrombine vraie (facteur II) sont ceux décrits par SOULIER et LARRIEU à l'exception du chlorure de calcium (0,033 M (87). Pour faire ce dosage de la prothrombine, on utilise un mélange d'un tiers de sérum normal humain oxalaté déprothrombiné par le sulfate de baryum et deux tiers de plasma bovin oxalaté adsorbé par le sulfate de baryum. Ce réactif est conservé par fraction de 2,5 ml en tubes de verre à - 20° C; il est décongelé le jour de l'expérience et jamais réutilisé.

La thromboplastine est un extrait chloroformé de cerveau humain obtenu d'après la technique de QUICK (80). Extemporanément, cette thromboplastine est mélangée à parties égales avec du Cl_2 Ca 0,033 M.

Technique

Dans une série de tubes de verre, au bain-marie à 37°, on recalcifie de 3 en 3 minutes les mixtures suivantes :

- 0,25 ml PPP substrat avec 0,25 ml Cl_2Ca 0,033 M dans 4 tubes (1 à 4)
- 0,24 ml PPP substrat plus 0,01 ml SP témoin et à tester avec 0,25 ml Cl_2Ca (5 et 6)
- 0,22 ml PPP substrat plus 0,03 ml SP témoin et à tester avec 0,25 ml Cl_2Ca (7 et 8)(0,01 ml et 0,03 ml SP correspondant respectivement à des concentrations plaquettaires finales de 20.000 et 60.000/mm^3).

Les temps de coagulation sont notés. A la 30ème minute après adjonction de calcium, après avoir éliminé le caillot de fibrine par enroulement autour d'une baguette de verre, on mesure à deux reprises pour chaque mixture le temps de coagulation du système; 0,1 ml mixture à différentes dilutions + 0,1 ml (NS + PDP) + 0,2 ml thromboplastine calcique.

Les tubes 1 à 4 sont dilués respectivement au 1/10, 1/20, 1/50,1/100 en tampon véronal acétate afin d'obtenir la courbe étalon. La dilution au 1/10 étant prise pour 100%, 1/20 50%, 1/50 20%, 1/100 10% . Les 4 tubes suivants, dilués dans le même tampon au 1/10, sont les témoins pour les tubes 5 et 7 et les sujets à tester pour le 6 et 8.

Expression des résultats

La prothrombine résiduelle est exprimée en pour - centage par rapport à une courbe étalon établie à l'aide des 4 premiers tubes, les droites étant tracées sur papier bilogarithmique.

Résultats

En recalcifiant toujours le même substrat en présence d'une même quantité de plaquettes, on peut noter (Fig. 1) que la prothrombine résiduelle à la 30ème minute est comprise: pour 20.000 plaquettes entre 51 et 62% (moyenne 56 ± 4%) et pour 60.000 plaquettes entre 13 et 21% (moyenne 17 ± 2,9%). La reproductibilité nous paraît très satisfaisante.

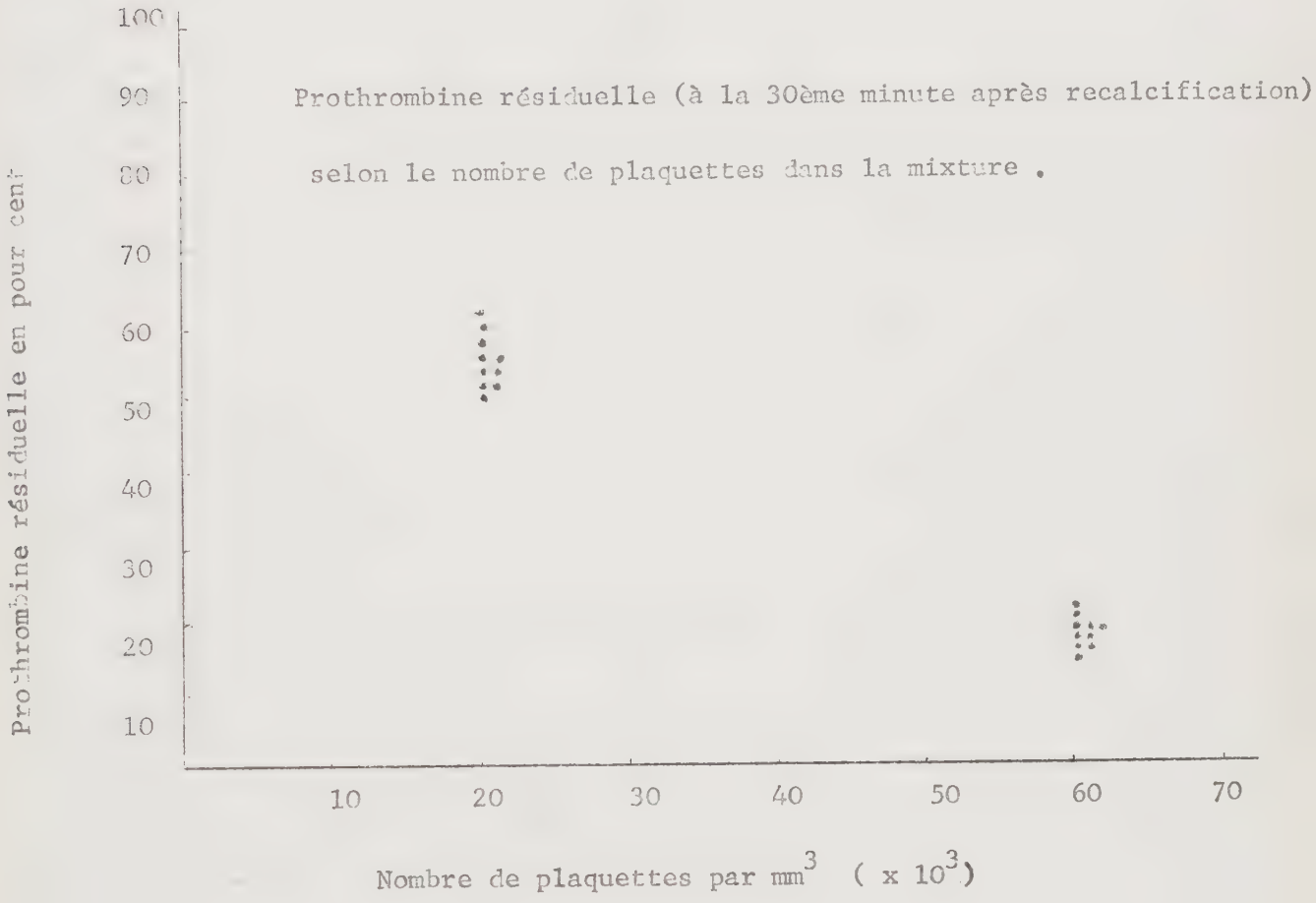


Figure 1

GENERATION DE THROMBINE

Principe

Il consiste à étudier la formation de thrombine au cours de la coagulation par le calcium d'un plasma pauvre en plaquettes (PPP substrat) auquel on ajoute un nombre connu de plaquettes.

Réactifs

PPP voir ci-dessus
SP voir ci-dessus
Solution de chlorure de calcium (0,033 M)
Suspension du fibrinogène bovin (fraction NBC Cleveland, Ohio) à 4 g/l en tampon véronal (pH 7,3) préparée 15 minutes avant le dosage et conservée à la température du laboratoire.

Technique

Dans un tube à hémolyse en verre, au bain-marie à 37° C, on met en présence :

- 0,48 ml PPP substrat + 0,02 ml SP témoin ou à tester avec 0,5 ml Cl_2Ca 0,033 M ou :
- 0,44 ml PPP substrat + 0,06 SP témoin ou à tester avec 0,5 ml Cl_2Ca 0,033 M

(0,02 ml et 0,06 ml SP correspondent respectivement à des concentrations plaquettaires de 20.000 et 60.000/mm^3 final).

Le témoin est représenté par 0,5 ml PPP substrat en présence de 0,5 ml Cl_2Ca 0,033 M.

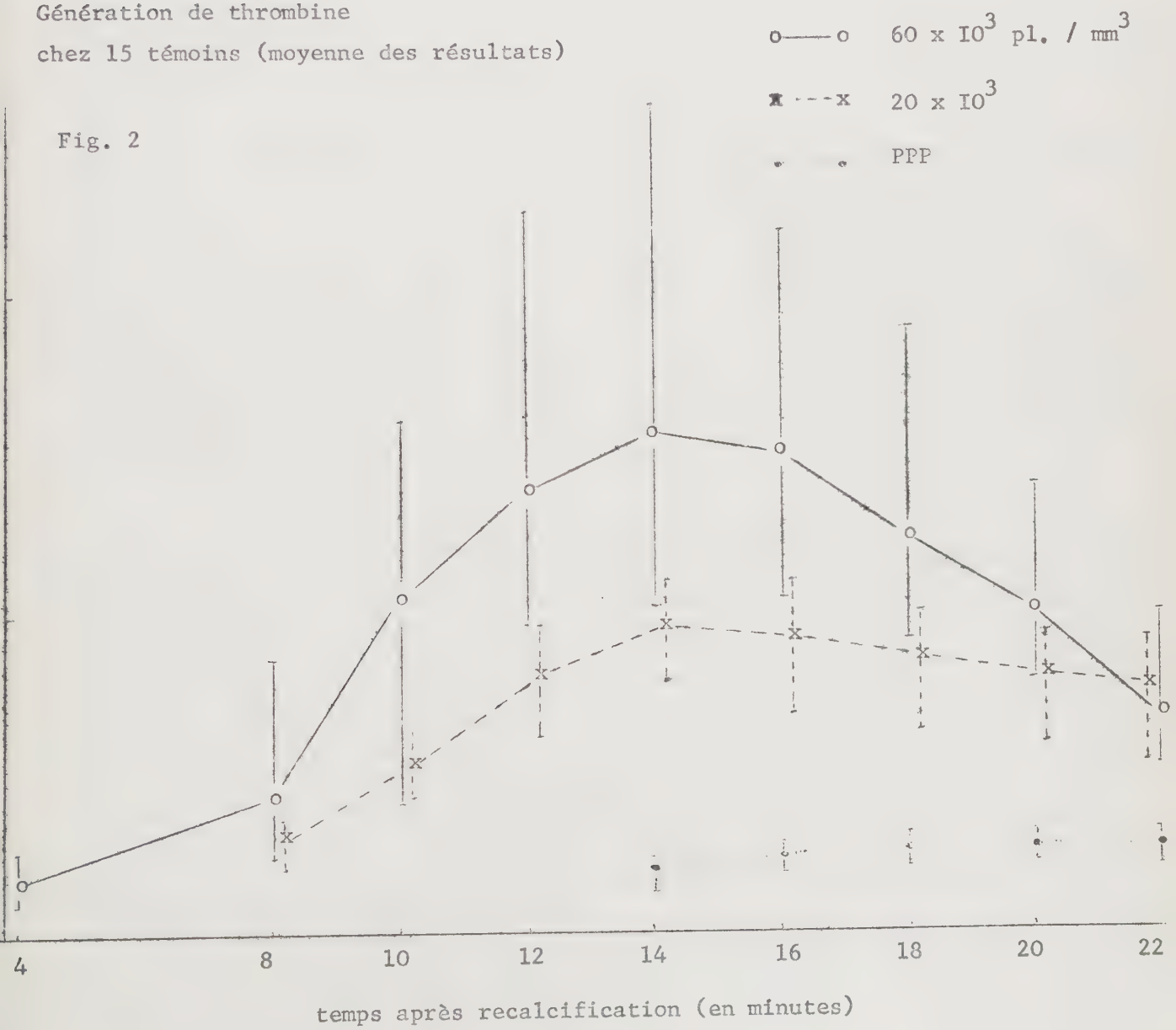
A la 4, 8, 10, 12, 14, 16, 20 et 22ème minute après recalcification, on mesure le temps de coagulation du système :
- 0,1 ml de la mixture + 0,2 ml de fibrinogène mis au bain-marie à 37° une minute avant la réaction. La fibrine formée dans la mixture est éliminée au fur et à mesure de sa formation par enroulement autour d'une baguette de verre.

Expression des résultats

Les temps obtenus sont exprimés en unités thrombiques formées au moyen d'une courbe construite à partir des temps de coagulation de la même solution de fibrinogène (0,2 ml à 4 g/l) par 0,1 ml d'une solution de thrombine° commerciale en tampon véronal pH 7,3 contenant respectivement 1, 2, 5, 10, 15, 20 unités NIH U/ml (Fig. 2) .

Génération de thrombine
chez 15 témoins (moyenne des résultats)

Fig. 2



° HOFFMANN-LA ROCHE, Bâle (Suisse)

Résultats

Les résultats obtenus par cette méthode sont très reproductibles. Sur la figure 2, on peut noter que sans plaquette , la génération de thrombine est minime, comprise entre 1 et 1,5 unités à la 16ème minute. En présence de 20.000 plaquettes, le nombre d'unités thrombiques formées est proche de 5 unités à la 14ème minute (variant de 4 à 5,5 unités). La vitesse d'inactivation est longue, elle est encore de l'ordre de 3 unités à la 22ème minute (variant de 2 à 4,5 unités). Enfin, en présence de 60.000 plaquettes, la thrombine formée est maximale à la 14ème minute, c'est-à-dire, 8 unités (variant de 5,5 à 13 unités). L'inactivation est plus rapide jusqu'à la 22ème minute puisqu'à ce moment, on trouve de 2,5 à 5 unités thrombiques résiduelles.

15) Modifications de nos 2 techniques de base pour l'appréciation de la " disponibilité " du facteur plaquettaire 3 .

Nous avons étudié la libération du facteur plaquettaire 3 , dans le système de génération de thrombine, en présence de kaolin, d'ADP et après 3 congélations-décongélations. Les mesures ont été faites avec des suspensions plaquettaires de 20.000 et 60.000/mm^3 final. Les deux concentrations ont constamment donné des résultats parallèles, mais les courbes obtenues avec 60.000 plaquettes nous ont paru plus démonstratives.

a) génération de thrombine en présence de kaolin.

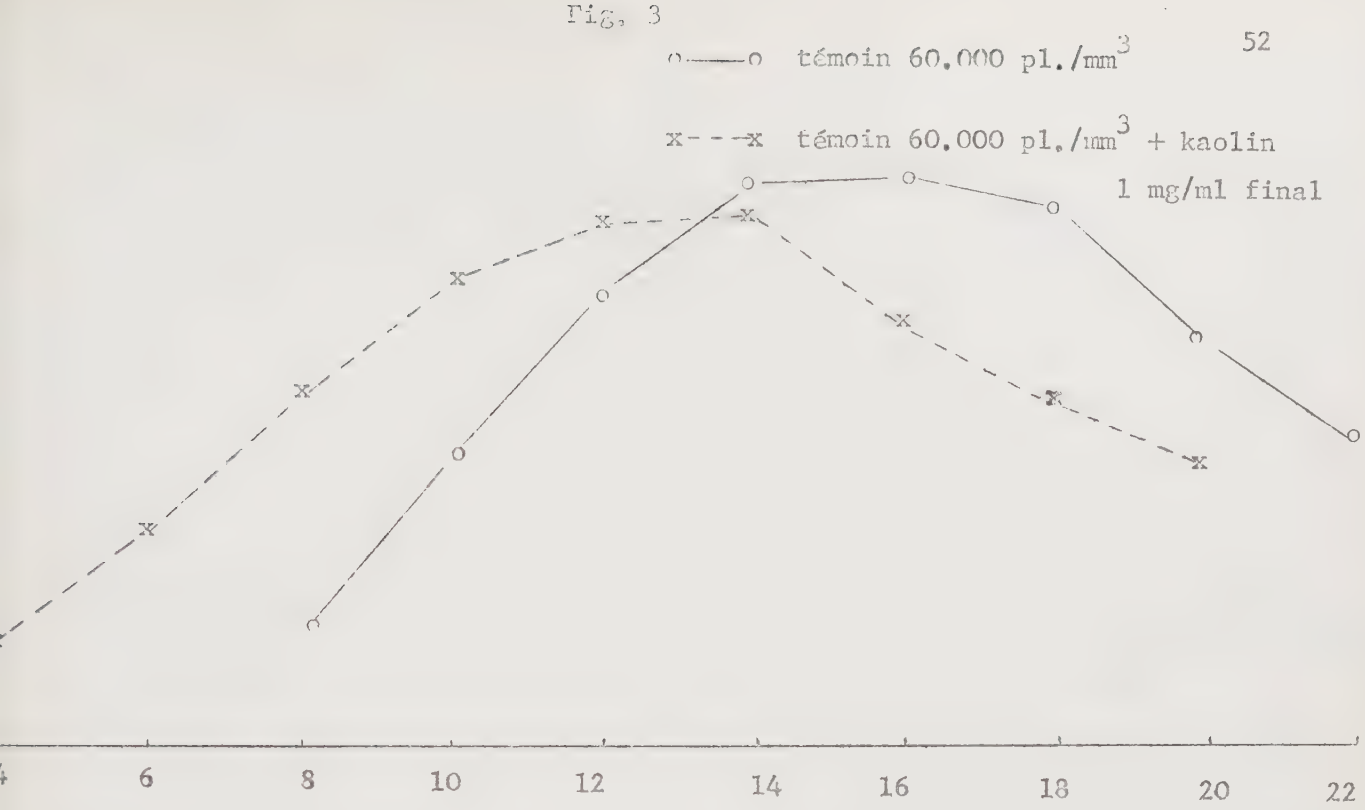
Nous avons utilisé une suspension de kaolin en tampon véronal-acétate à la concentration de 100 mg/ml. La composition de la mixture de génération a dû être modifiée :

- PPP substrat 0,43 ml
- SP (10^5) 0,06 ml
- kaolin 0,01 ml (1 mg/ml final)
- Cl_2Ca (0,033M) 0,50 ml

Dans la mixture témoin, la suspension de kaolin est remplacée par du tampon.

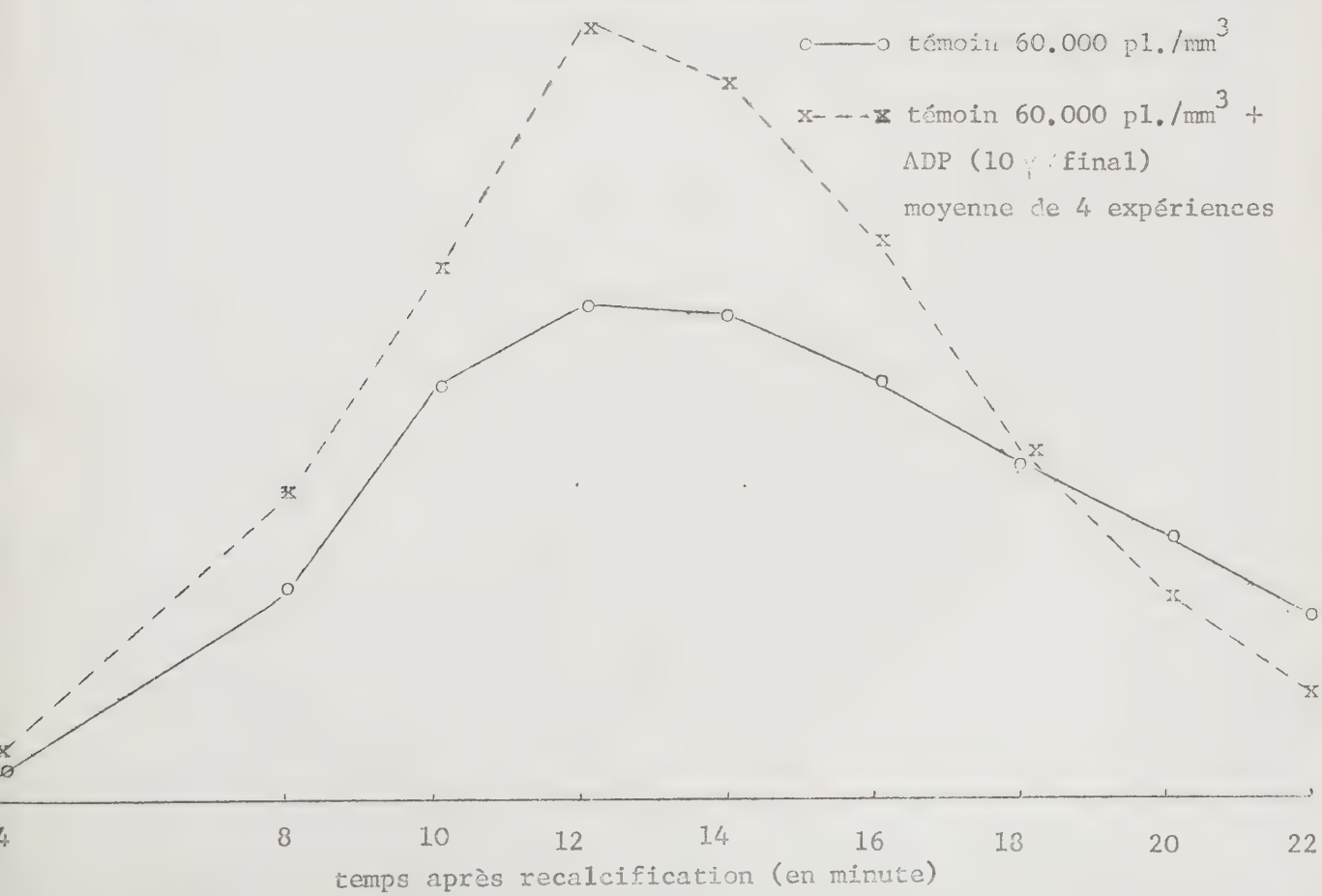
La libération du facteur plaquettaire 3 est précoce et le pic d'activité pratiquemment identique au témoin.

Fig. 3



b) génération de thrombine en présence d'ADP.

L'ADP (Boehringer) est en solution dans du tampon véronal-acétate à la concentration de 1000 γ /ml. La mixture est modifiée comme dans l'expérience précédente: 0,01 ml de cette solution d'ADP permet d'obtenir une concentration finale de 10 γ /m



Les courbes obtenues dans 4 expériences montrent une vitesse de libération du facteur plaquettaire 3 peu différente du témoin, mais le pic d'activité est nettement plus élevé (11 unités thrombiques au lieu de 7) .

c) génération de thrombine après 3 congélations-décongélations.

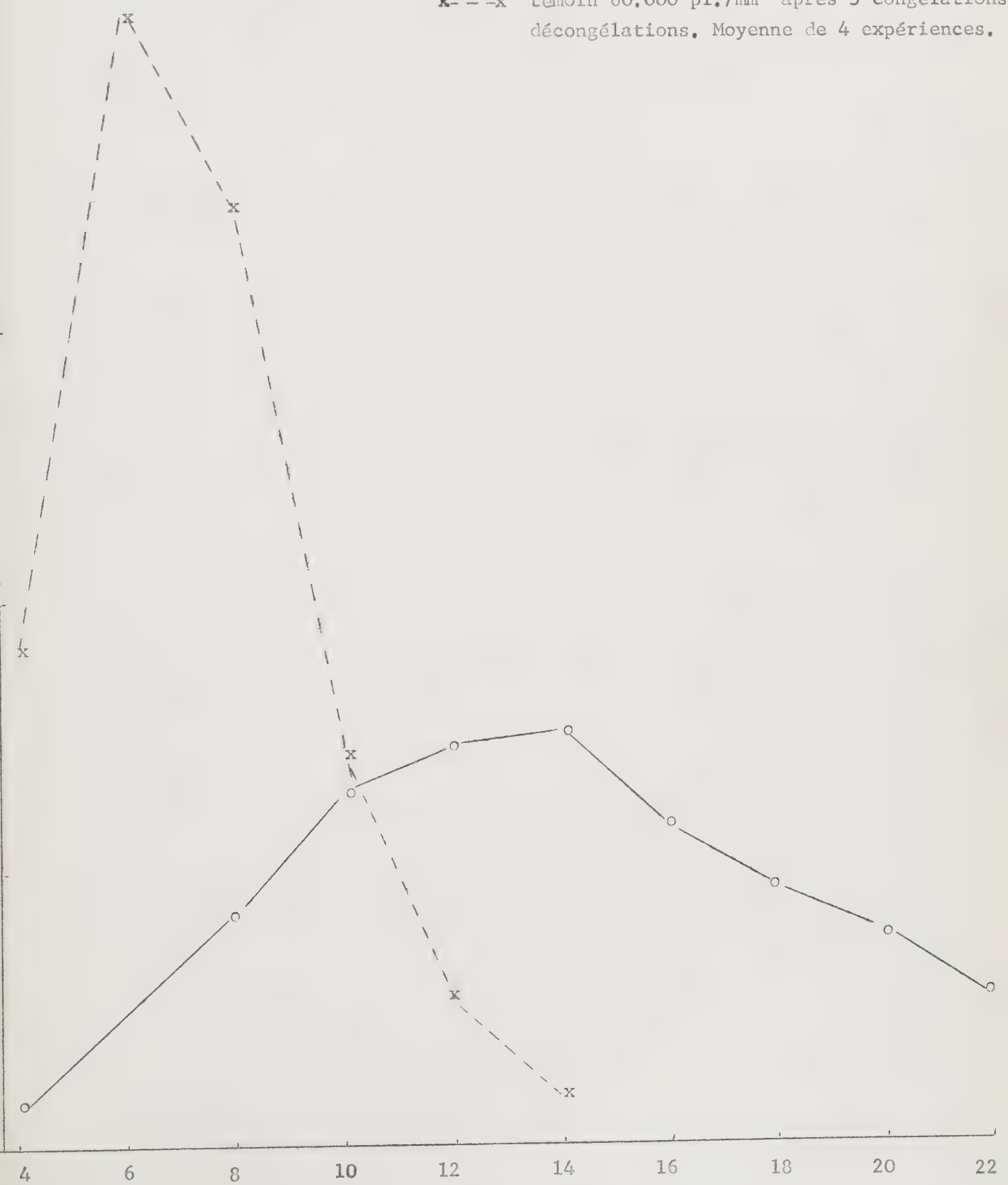
La suspension plaquettaire est congelée dans un mélange carboglace-alcool et décongelée au bain-marie à 37° C à trois reprises. Dans le système de génération de thrombine, 0,06 ml de la suspension congelée-décongelée remplace 0,06 ml de suspension plaquettaire intacte.

La libération de facteur plaquettaire 3 est immédiate et très élevée correspondant vraisemblablement à l'activité coagulante totale des plaquettes. C'est ainsi qu'à la 6è minute, il existe dans ces conditions, 20 unités thrombiques tandis que sans congélation-décongélation le nombre d'unités thrombiques formées à ce moment est de 2,5 unités, il est au maximum de 7,5 unités; à ce pic d'activité thrombique, succède après congélation-décongélation une rapide inhibition de la thrombine formée (sans doute sous la dépendance de l'antithrombine progressive).

Fig. 5

o——o témoin 60.000 pl./mm^3

x- - -x témoin 60.000 pl./mm^3 après 3 congélations-décongélations. Moyenne de 4 expériences.



III) ETUDE DE LA COAGULATION

1 - Temps de coagulation

selon la méthode de LEE et WHITE (60). Le sang total, prélevé dans deux tubes rincés au sérum physiologique, est placé au bain-marie à 37° .
Normale : de 6 à 12 minutes.

2 - Consommation de prothrombine

selon la méthode de J.P. SOULIER (86) en deux temps. Normale : égale ou supérieure à 60 secondes.

3 - Temps de Quick

selon la méthode originale de l'auteur (80). La thromboplastine est un extrait acétoné de cerveau humain.

4 - Dosage différentiel des éléments du complexe prothrombique : Prothrombine vraie (II), proaccélérine (V), complexe VII (VII + X), d'après OWREN et AAS (73), SOULIER et LARRIEU (87).

5 - Dosage du facteur VIII

selon la méthode en 2 temps de BIGGS, EVELING et RICHARDS (9) avec les modifications suivantes :
- céphaline préparée selon BELL et ALTON (extrait chloroformé de cerveau humain).
- accélérine préparée selon la méthode de BIGGS, à partir de sérum de boeuf adsorbé par le carbonate de baryum.

6 - Dosage du facteur IX

selon la méthode en un temps de SOULIER et LARRIEU (88).

7 - Dosage du fibrinogène

méthode pondérale après coagulation par la thrombine du plasma dilué.

R E S U L T A T S

I) DYSTROPHIE THROMBOCYTAIRE HEMORRAGIPARE

Tableau I - Tests de l'Hémostase

	Obs. 1	Obs. 2	Obs. 3
Temps de saignement DUKE (en minutes)	> 10	> 10	> 30
IVY	> 15	> 30	> 30
Plaquettes par mm^3 (x 10^3)	90	65	100
Rétraction du caillot	Normale	Normale	Normale
Aspect sur lame	Géantes	Géantes	Dysmorphiques plus grandes que normales
Temps de coagulation (en minutes)	11	10	7 1/2
Consommation de prothrombine. Méthode en 2 temps (en secondes)	25	22	20
Temps de Quick (en pour cent)	100	100	100
Facteur VIII en pour cent	120		125
Facteur IX en pour cent	70		50 > 100
Fibrinogène (en g/litre)	2,6	2,15	2,35

Tableau 2 - Fonctions Plaquettaires.

		Obs. 1	Obs. 2	Obs. 3
Adhésivité (en pour cent)	Borchgrevink	11	15 29	14
Agrégation à l'ADP (2 /ml)	Macroscopique (en sec.)	32	21	36
	Photométrique (diminution d.o.)	21 (témoin=26)		
Activité agrégante du sérum 30 minutes après thrombine (en sec.)		24	33	32
Temps de Stypven (en sec.)	Calcique	33	58	36
	Céphaline	11	16	12
T.G.T. plaquettaire		Normal	Normal	Normal
Disponibilité du F.P. 3 en présence de kaolin	Temps de recalcification (sec.)	42	53	
	Temps de Stypven après 20 minutes d'incubation (sec.)	24	35	
Thromboélastogramme	r en	13		13
	k mm.	6		7
	A.m.	65		65

De nos trois observations de D.T.H., deux (obs. 1 et 3) présentent un syndrome hémorragique grave, débutant dès l'enfance, dominé par les hémorragies génitales chez l'une, les épistaxis chez l'autre. Dans les deux fratries, plusieurs enfants sont morts d'hémorragie avant 5 ans. Dans un cas (obs. 2) les accidents paraissent moins graves mais les épistaxis ont nécessité de nombreuses transfusions.

Etude de l'hémostase

Le temps de saignement est constamment allongé (Duke et Ivy) mais il faut tenir compte de la thrombopénie modérée. Le gigantisme plaquettaire est évident dans 2 cas (1 et 2), moins net dans le troisième où la taille des plaquettes est modérément augmentée mais leur aspect nettement anormal en microscopie de phase.

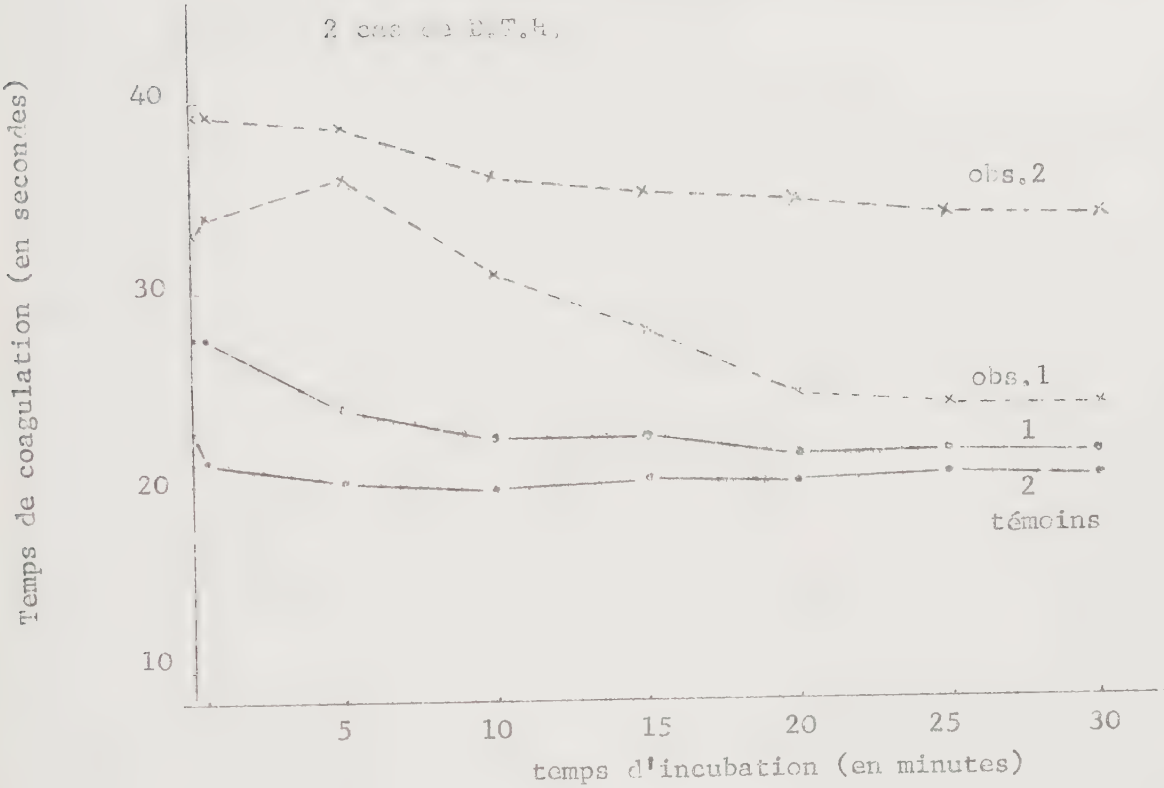
Les tests généraux de la coagulation et les différents facteurs dosés sont constamment normaux, exception faite de la consommation de prothrombine qui est toujours modérément diminuée.

L'adhésivité des plaquettes à la brèche vasculaire est diminuée dans nos trois observations sauf à un examen (obs. 2). L'agrégation macroscopique à l'ADP, l'agrégation photométrique dans le seul cas où elle a pu être faite, ont toujours été trouvées dans les limites de la normale, compte tenu de la thrombopénie. L'activité agrégante du sérum est constamment normale.

Les tests mesurant l'activité coagulante des plaquettes donnent des résultats discordants mais semblables chez nos trois malades. Le temps de Stypven calcique est modérément allongé et dans un cas (obs. 2) franchement allongé. Ces anomalies sont corrigées en présence de céphaline. Le test de génération de la thromboplastine est constamment normal; dans 2 cas (obs. 2 et 3) les plaquettes dystrophiques génèrent plus de thromboplastine que le témoin. Au thromboélastogramme, k est raccourci et a.m. supérieure à la normale.

Le temps de recalcification du PRP en présence de kaolin est normal, dans l'observation 1, il est plus court que le témoin. A l'inverse, le temps de Stypven en présence de kaolin révèle dans les 2 cas où il a été fait (obs. 1 et 2) une diminution de la disponibilité du facteur plaquettaire 3.

Mesure du F.P. 3 par le temps de Stypven en présence de 50.000 pl./mm^3 et de kaolin (20 mg/ml) dans 2 cas de D.T.H.



Méthodes personnelles d'étude du facteur plaquettaire 3

1) Etude de la consommation de prothrombine

a) en présence de 60.000 plaquettes par mm^3, prothrombine résiduelle à la 30ème minute (en pour cent)

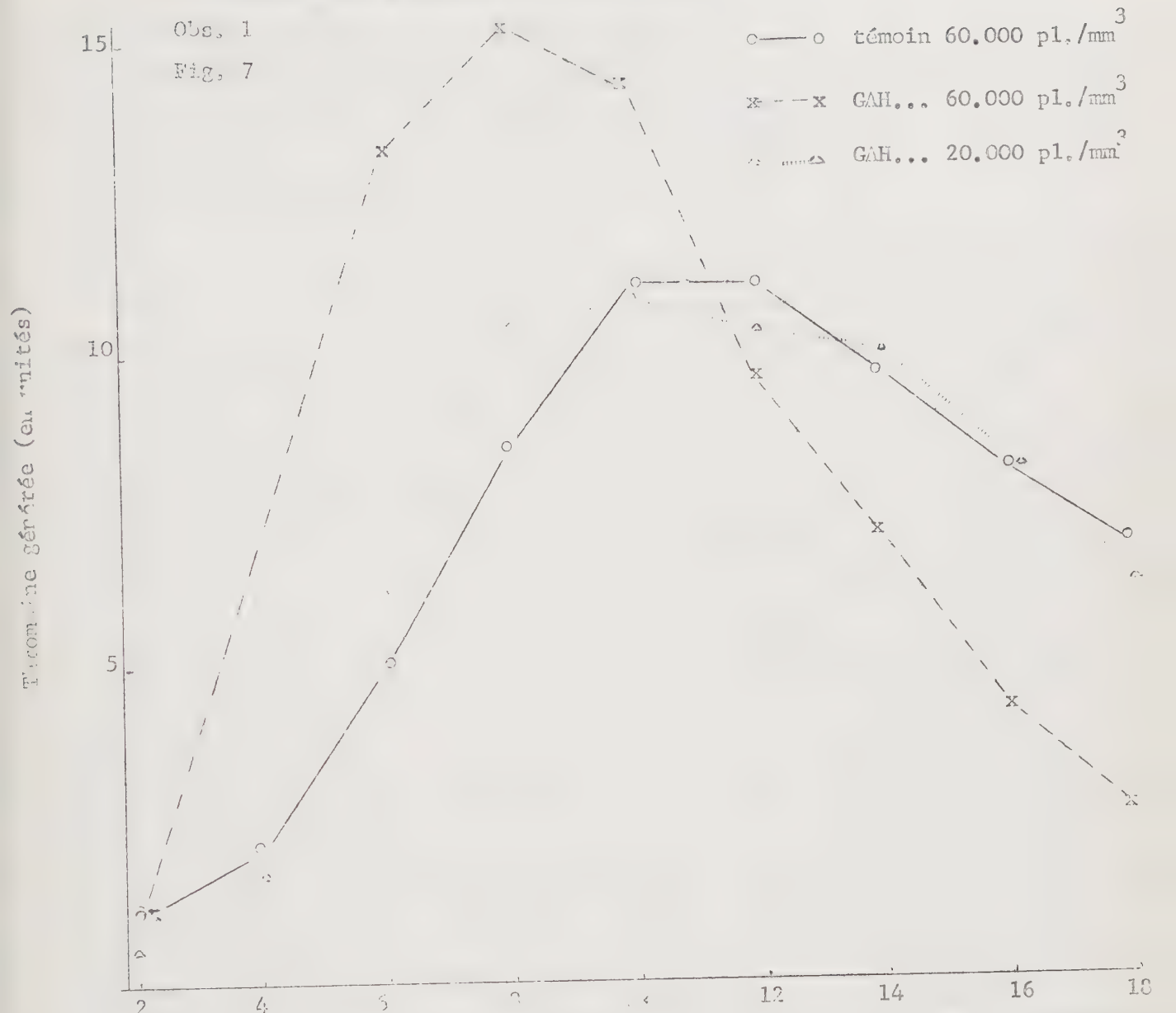
Témoin	Obs. 1(moyenne de 2 déterminations)	Témoin	Obs. 2
10	5	23	13

b) en présence de 20.000 plaquettes par mm^3, prothrombine résiduelle à la 30ème minute (en pour cent)

Témoin	Obs. 1(moyenne de 2 déterminations)	Témoin	Obs. 2
48	16	64	45

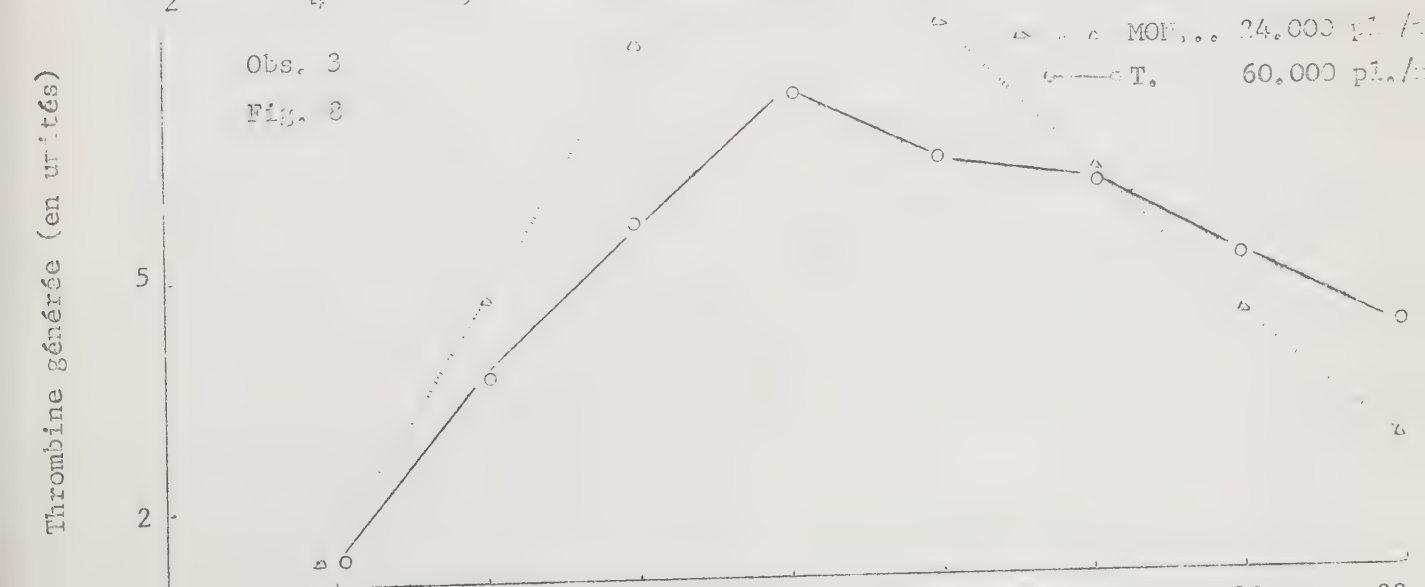
2) Etude de la génération de thrombine

Obs. 1
Fig. 7



Thrombine générée (en unités)

Obs. 3
Fig. 8



Thrombine générée (en unités)

Les résultats obtenus par les deux techniques (génération de thrombine et consommation de la prothrombine) semblent concordantes. L'activité coagulante libérée des plaquettes dystrophiques, dans nos conditions d'expérience, est nettement supérieure à celle des plaquettes témoins. Les courbes de génération de thrombine montrent que cette activité est grossièrement triple de la normale.

II) THROMBASTHENIE

Tableau 3 - Tests de l'Hémostase

	Obs. 4	Obs. 5	Obs. 6
Temps de saignement DUKE (en minutes)	> 10	7	15
IVY		> 30	> 30
Plaquettes par mm^3 ($\times 10^3$)	300	210	125
Aspect sur lame	isolées	isolées	isolées
Rétraction du caillot	nulle	diminuée	nulle
Temps de coagulation (en minutes)	7		5
Consommation de prothrombine Méthode en 2 temps (en sec.)	> 60	30	> 60
Temps de Quick en pour cent	93	72	92
Facteur II en pour cent	100		92
Facteur V en pour cent	100		87
Complexe VII + X en pour cent	60		90
Facteur VIII en pour cent		104	125
Facteur IX en pour cent		> 100	90
Fibrinogène (en g/litre)			3

Tableau 4 - Fonctions Plaquettaires

		Obs. 4	Obs. 5	Obs. 6
Adhésivité (en pour cent)	Borchgrevink	22		
	Rétention sur billes de verre (Salzman)		18	23
Agrégation à l'ADP(2 /ml)	Macroscopique (en sec.)	60		
	Photométrique (diminution D. O.)	15	12	
Activité agrégante du sérum 30 minutes après thrombine (en sec.)		10		
Temps de Stypven Calcique (en sec.)			33,4	46
	Céphaline		10,8	13,6
T.G.T. Plaquettaire		Normal		
Disponibilité du F.P. 3 en présence de kaolin	Temps de recalcification (en sec.)	48	79	
	Temps de Stypven après 20 minutes d'incubation (en sec.)		35	
Thromboélastogramme A.m. en mm		30		

Nos 3 cas de thrombasthénie répondent aux critères habituels du diagnostic. Le temps de saignement est constamment allongé par la méthode d'Ivy. Les plaquettes, en nombre normal ou subnormal, apparaissent sur lame rondes et isolées. Le caillot de sang total est constamment irrétractile.

La consommation de prothrombine est dans 1 cas (obs.5) un peu diminuée, tous les facteurs plasmatiques de coagulation dosés sont dans les limites de la normale.

L'étude des fonctions plaquettaires met en évidence deux anomalies : une adhésion à la limite inférieure de la normale et une absence d'agrégation en présence d'ADP extrinsèque.

Facteur plaquettaire 3

a) Le temps de Stypven calcique est modérément allongé, le temps de Stypven céphaline normal. La thromboplastinoformation n'a été étudiée que dans 1 cas (obs. 4) et se révèle normale. La disponibilité du facteur plaquettaire 3 en présence de kaolin, mesurée par le temps de recalcification ou le temps de Stypven est constamment diminuée.

b) Résultats obtenus par la génération de thrombine et la consommation de prothrombine.

1) Etude de la consommation de la prothrombine

a) en présence de 60.000 plaquettes par mm^3, prothrombine résiduelle à la 30ème minute (en pour cent)

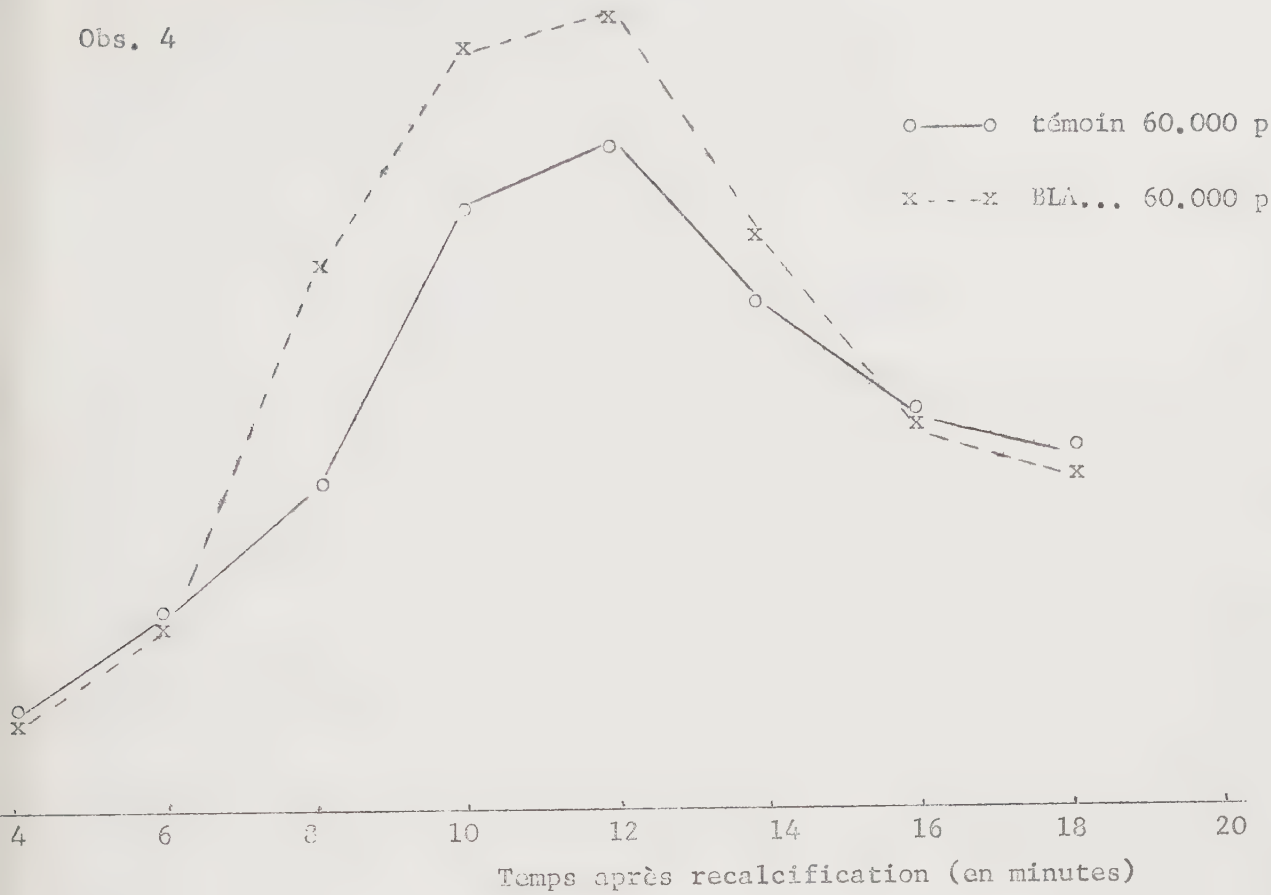
Témoin moyenne des 3 examens	Obs. 4	Obs. 5	Obs. 6
17 ± 4	8,5	14	12

b) en présence de 20.000 plaquettes par mm^3, prothrombine résiduelle à la 30è minute (en pour cent)

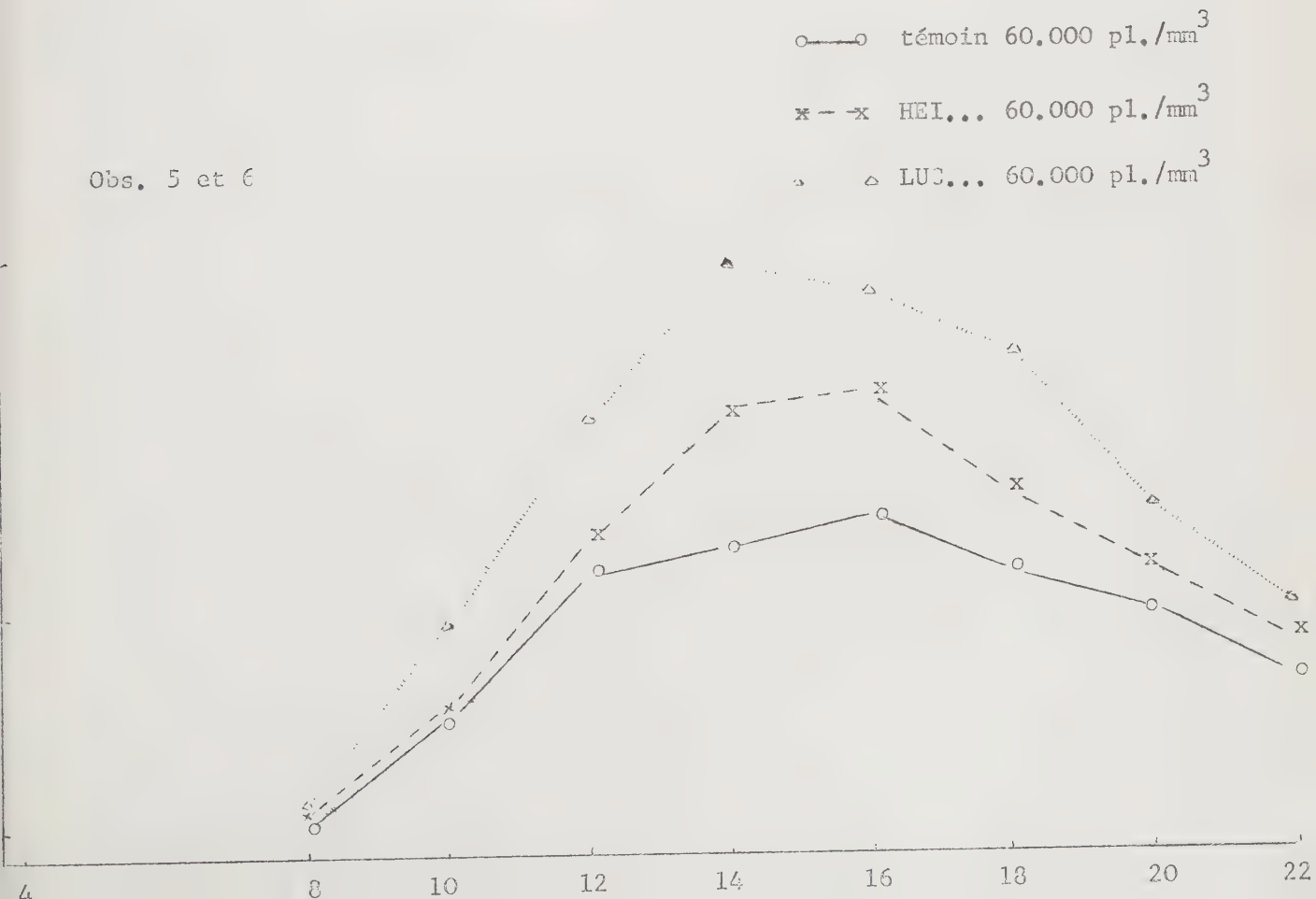
Témoin moyenne des 3 examens	Obs. 4	Obs. 5	Obs. 6
55 ± 4	37	66	30

2) Etude de la génération de thrombine

Obs. 4



Obs. 5 et 6



La concordance des résultats par les deux techniques parait bonne. Il existe une augmentation constante de la quantité de facteur plaquettaire 3 libéré des plaquettes thrombasthéniques. Cette augmentation est modérée et la vitesse de libération est identique à celle du témoin.

III) ALLONGEMENT DU TEMPS DE SAIGNEMENT

Tableau 5 - Tests de l'Hémostase

	Obs. 7	Obs. 8	Obs. 9	Obs. 10	Obs. 11
Temps de saignement DUKE (en minutes)	5	3 1/2	> 10	6	5 1/2
IVY	14 1/2	25	> 30	> 30	> 15
Plaquettes par mm^3 ($x10^3$)	225	385	300	240	340
Rétraction du caillot	Normale	Normale	Normale	Normale	
Temps de coagulation (en minutes)	9	9 1/2	LL	9	8
Consommation de Prothrombine. Méthode en 2 temps (sec.)	> 60	35	> 60	45	> 60
Temps de Quick en pour cent	97,5	82,5	82,5	> 100	
Facteur VIII en pour cent	87,5	110	75	112	>100
Facteur IX en pour cent	92,5	85	> 100	> 100	>100
Fibrinogène (en g/litre)	2,65	1,6	2,65		2,35

Tableau 6 - Fonctions plaquettaires

	Obs. 7	Obs. 8	Obs. 9	Obs. 10	Obs. 11
Adhésivité (en pour cent) Rétention sur billes de verre (Salzman)	24,6 16,5	1,6 1,8	30,7 3	12 3,5	16,3
Agrégation à l'ADP Photométrique (diminution d.o.)	65		63	57	57
Activité agrégante du sérum 30 minutes après thrombine (en sec.)	16	10 1/2	12 1/2		11
Temps de Stypven (en sec.) Calcique	30	39	33	30	
Céphaline	10	13	12	12	
Disponibilité du F.P. 3 en présence de kaolin Temps de recalcification (en sec.)	42	34	76	60	33

Parmi ces allongements du temps de saignement, deux cas présentent un syndrome hémorragique (obs. 9 et 10). Les trois autres sont cliniquement inapparent et n'ont été révélé que par un examen systématique (obs. 8) ou par une hémorragie importante après avulsion dentaire.

Le temps de saignement par la méthode d'Ivy est constamment allongé, normal ou modérément allongé par la méthode de Duke, sauf dans un cas (obs. 9). Le chiffre de plaquettes, la rétraction du caillot sont normaux . Les tests généraux de la coagulation, le temps de Quick, les facteurs VIII et IX sont normaux.

Les anomalies des fonctions plaquettaires sont variables :

- l'adhésivité aux billes de verre (Salzman) est franchement abaissée dans 3 cas (obs. 8, 10 et 11), à la limite inférieure de la normale dans 1 cas (obs.7), ininterprétable dans le dernier cas.

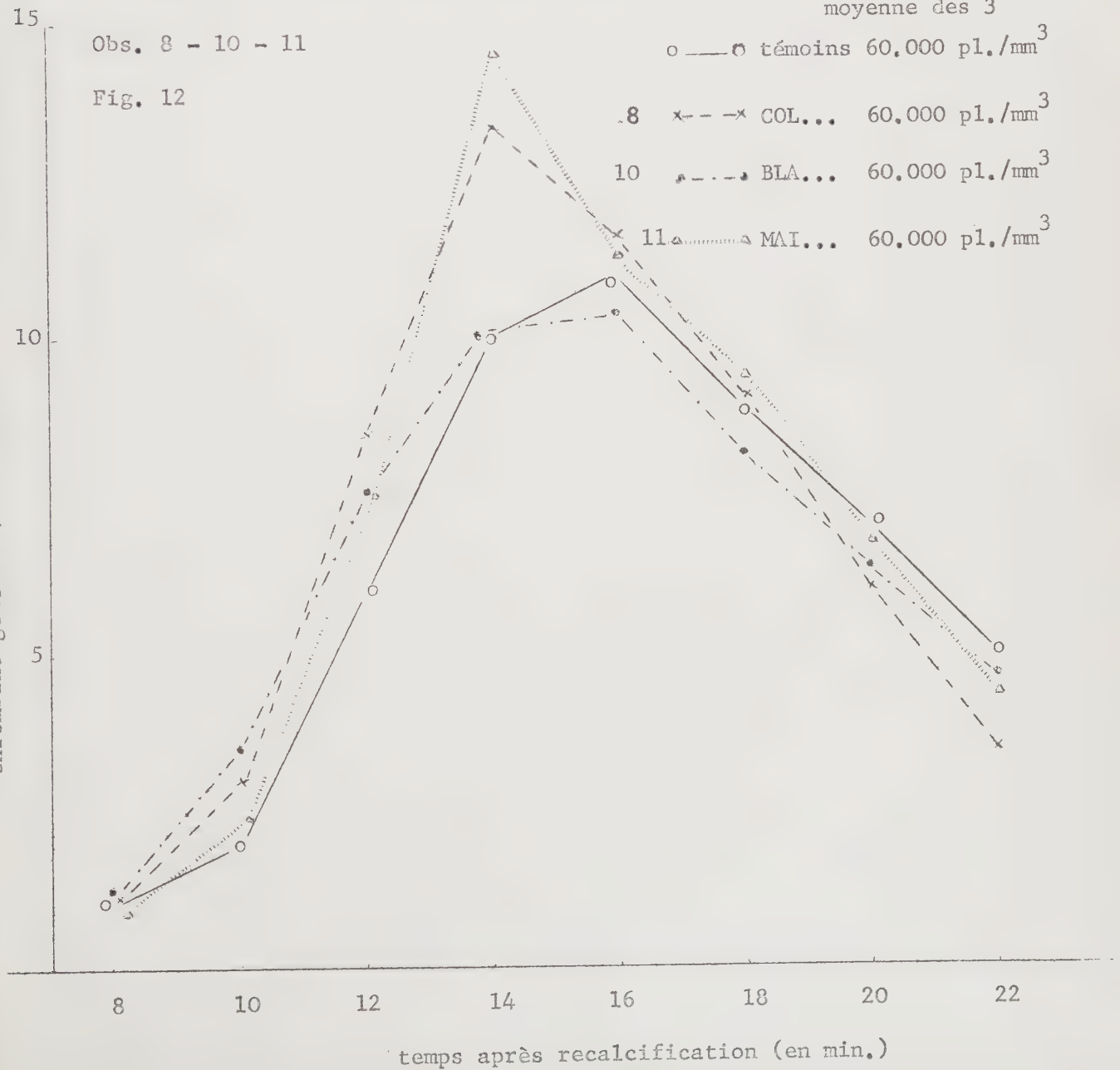
- l'agrégation photométrique en présence d'ADP extrinsèque est constamment normale
- l'activité agrégante du sérum est normale.

Etude du facteur plaquettaire 3

Le temps de Stypven calcique est toujours à la limite de la normale, entièrement corrigé en présence de céphaline. La disponibilité du facteur plaquettaire 3 est anormale dans un seul cas (obs. 9). Nous avons étudié la libération du facteur plaquettaire 3 par la seule génération de thrombine. Dans 3 cas (obs. 8, 10 et 11) nous avons obtenu une génération tout à fait comparable à celle des témoins. Les pics d'activité sont légèrement variables mais les pentes de croissance et de décroissance de l'activité coagulante sont pratiquement superposables.

Obs. 8 - 10 - 11

Fig. 12



Dans un cas (obs. 9), il semble exister un retard à la libération du facteur plaquettaire 3; le pic d'activité est comparable au témoin. En substituant le plasma déplaquettisé du malade au PPP habituellement utilisé comme substrat, cette anomalie est entièrement corrigée.

Fig. 13

Obs. 9

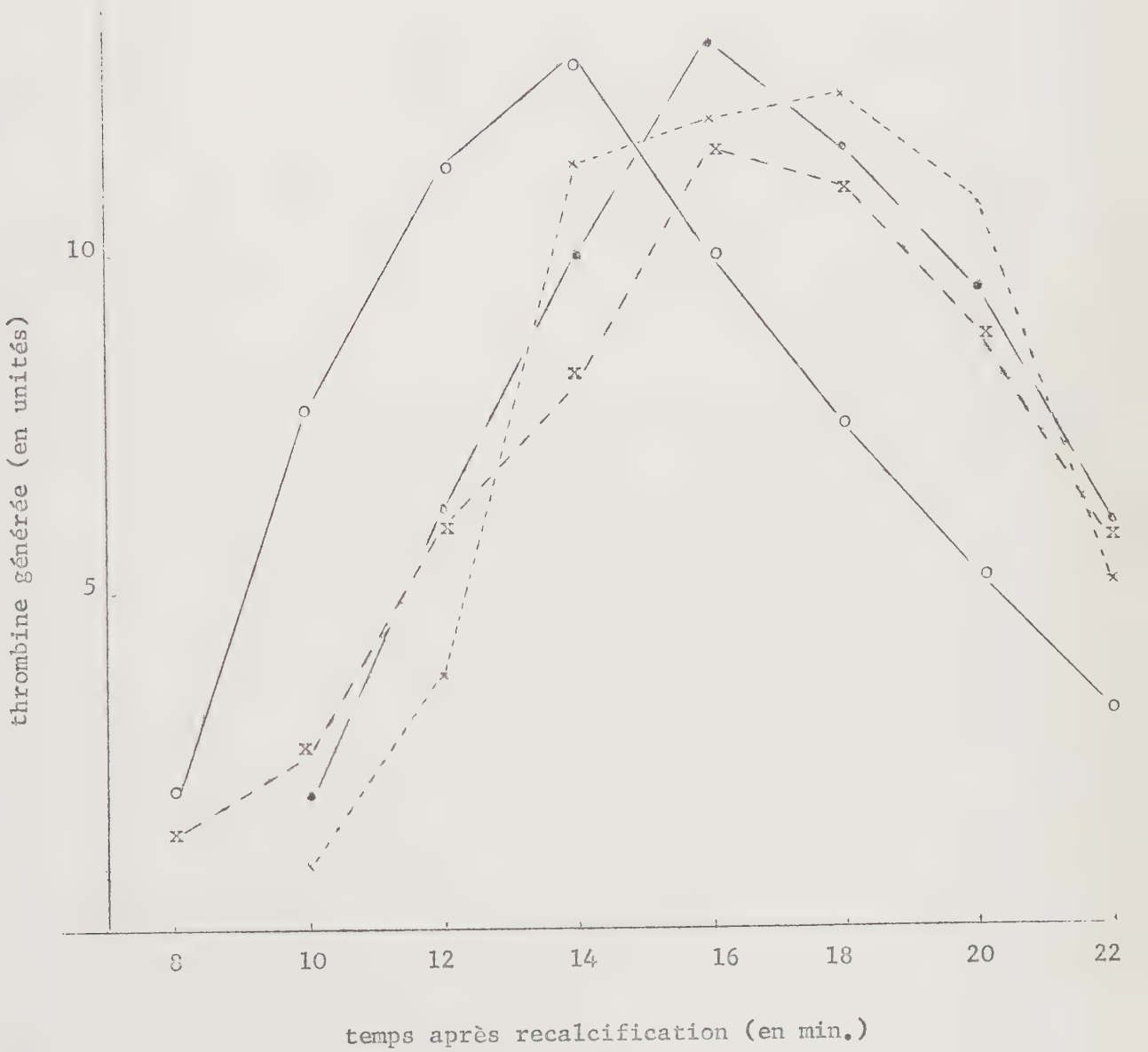
test de génération de thrombine

o——o témoin 60.000 pl./mm^3

x — — x JOL... 60.000 pl./mm^3

•——• Témoin 60.000 pl./mm^3 | substrat

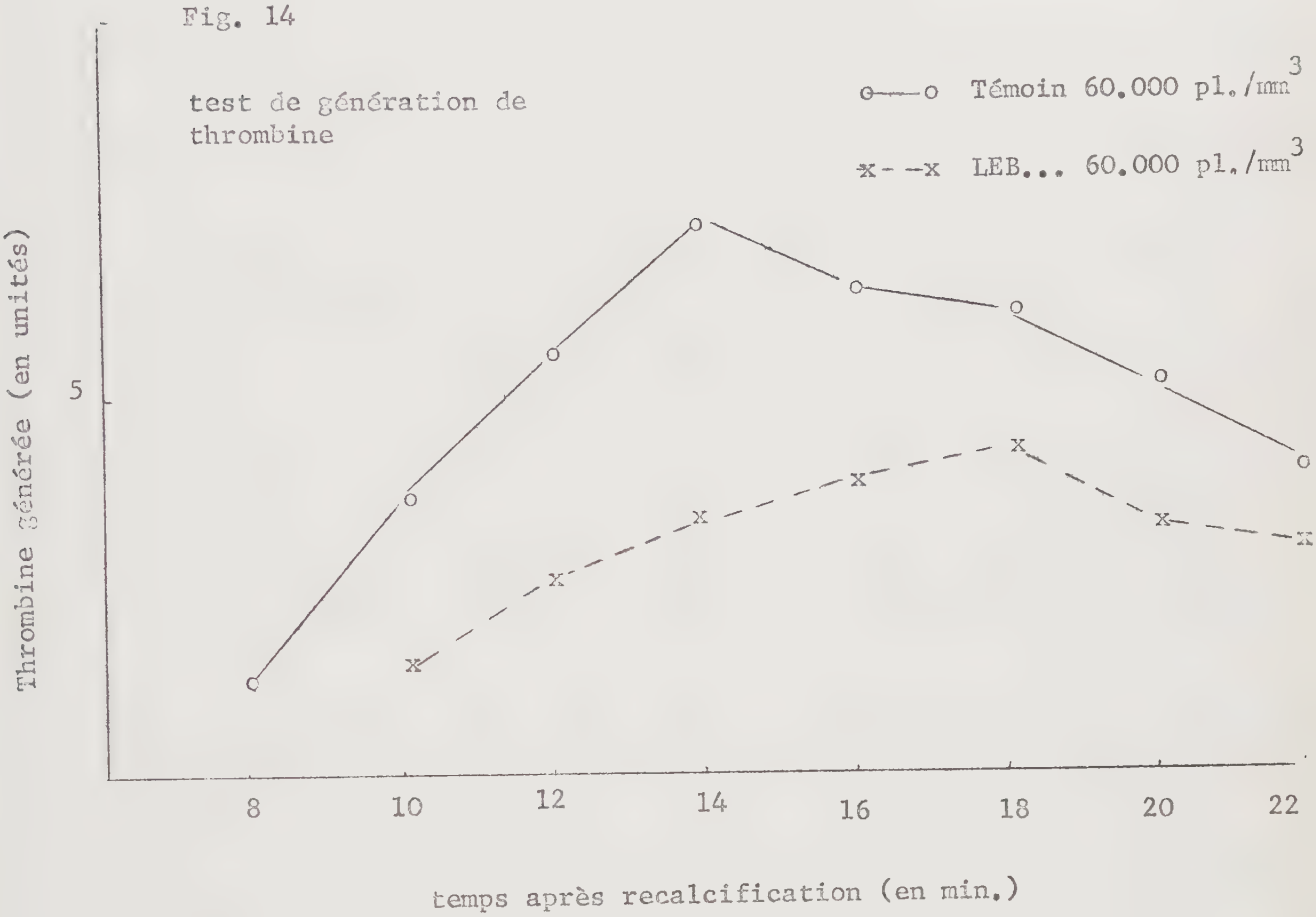
x- - - -x JOL... 60.000 pl./mm^3 | PPP JOL...



Enfin, dans l'observation 7, nous avons noté à la fois, un retard de libération et une nette diminution du pic d'activité.

Obs. 7

Fig. 14



IV) SYNDROMES MYELOPROLIFERATIFS

Tableau 7 - Tests de l'hémostase

	Obs. 12		Obs. 13
	1.12.65	15.3.67	
Temps de saignement DUKE (en minutes)	3 1/2	2	10
IVY	I9	10 1/2	
Plaquettes par mm^3 (x 10^3)	655	220	60
Aspect sur lame	dysmorphique	normal	
Rétraction du caillot	normale	normale	diminuée
Temps de coagulation (en minutes)	16	10 1/2	9
Consommation de Prothrombine. Méthode en 2 temps (en secondes)	50	20	25
Temps de Quick en pour cent	82		74,5
Facteur II en pour cent			71
Facteur V en pour cent			67
Complexe VII + X en pour cent			> 100
Fibrinogène (en g/litre)	3,65		4,65

Tableau 8 - Fonctions plaquettaires

		Obs. 12	Obs. 13
Adhésivité (en pour cent)	Borchgrevink	13,2	20
	Rétention sur billes de verre (Salzman)	2,3	
Agrégation à l'ADP (2 γ /ml)	Macroscopique (en sec.)		42
Activité agrégante du sérum 30 minutes après thrombine (en sec.)		14 (T 25)	42 (T 37)
Temps de Stypven (en sec.)	Calcique	31	35
	Céphaline	12	10

Tableau 9 - Examen hématologique

	Obs. 12	Obs. 13
Erythrocytes x 10^6 (mm^3)	4,2	
Hémoglobine (g %)	14,5	10,5
Erythroblastes dans le sang circulant		Présence
Leucocytes x 10^3 (mm^3)	18	26,4
Polynucléaires Neutrophiles	81	43
(en pour cent) Eosinophiles	1	
Basophiles		1
Lymphocytes (en pour cent)	6	18
Monocytes (en pour cent)	10	2
Myélémie (en pour cent)	2	36

Au cours de l'évolution de notre cas de leucémie myéloïde chronique, nous avons noté des modifications des tests de l'hémostase peut être liées à la thérapeutique. Le nombre et la morphologie des plaquettes sont revenus à la normale; le temps de saignement n'est plus que légèrement allongé par la méthode d'Ivy. Par contre, la consommation de prothrombine est devenue nettement pathologique.

Au moment où nous avons étudié cette malade, la seule anomalie de la coagulation est cette diminution de la consommation de prothrombine. L'adhésivité des plaquettes "in vivo" et la rétention sur billes de verre sont toutes deux diminuées; l'activité agrégante du sérum est normale. Le temps de stypven calcique est dans les limites de la normale.

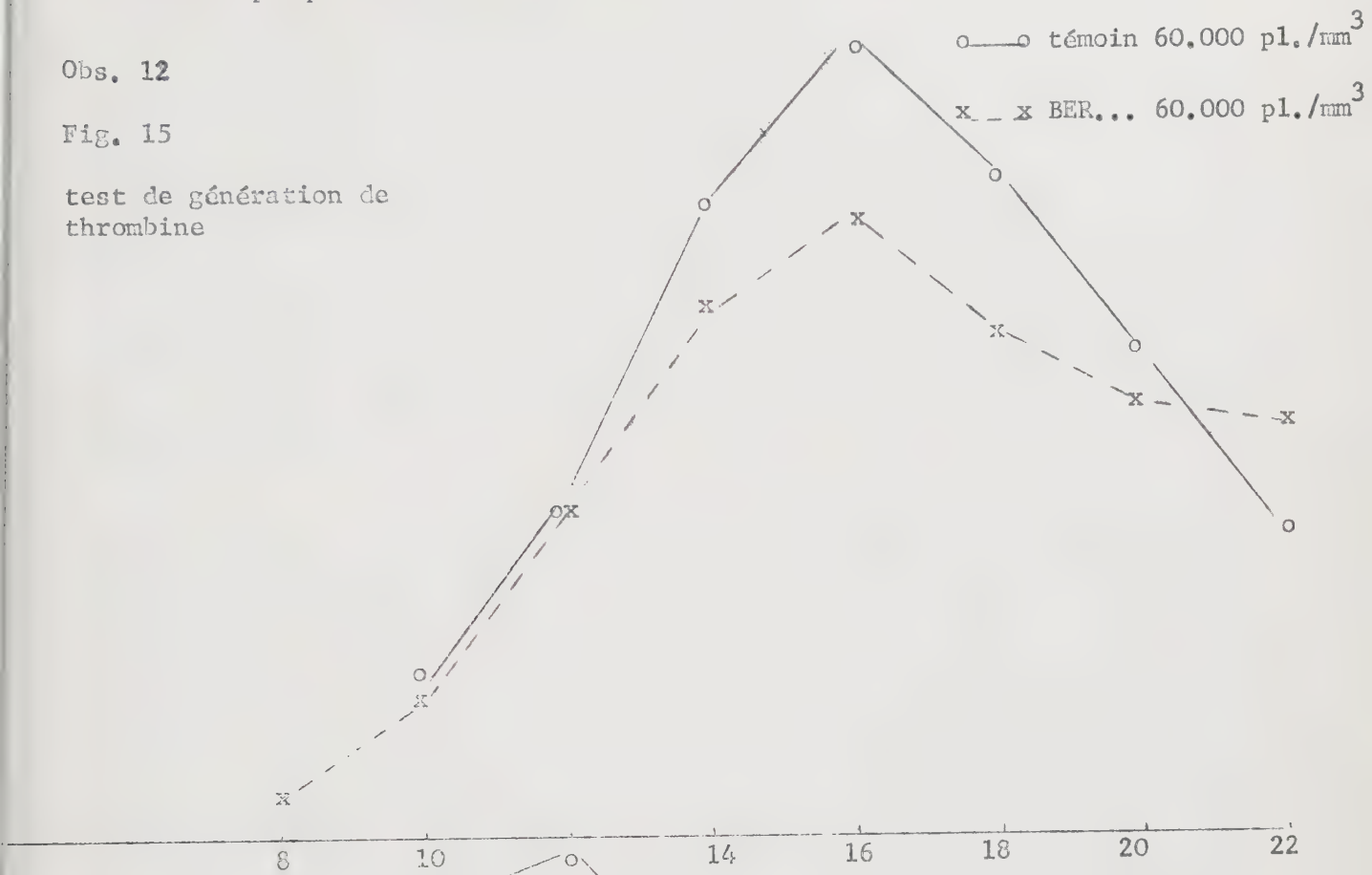
Dans le cas de splénomégalie myéloïde, le temps de saignement par la méthode de Duke est très allongé, la rétraction du caillot diminuée,

la consommation de prothrombine nettement inférieure à la normale. Ces résultats sont difficile à interpréter en raison de la thrombopénie. Toutes les fonctions plaquettaires étudiées sont dans les limites de la normale.

Obs. 12

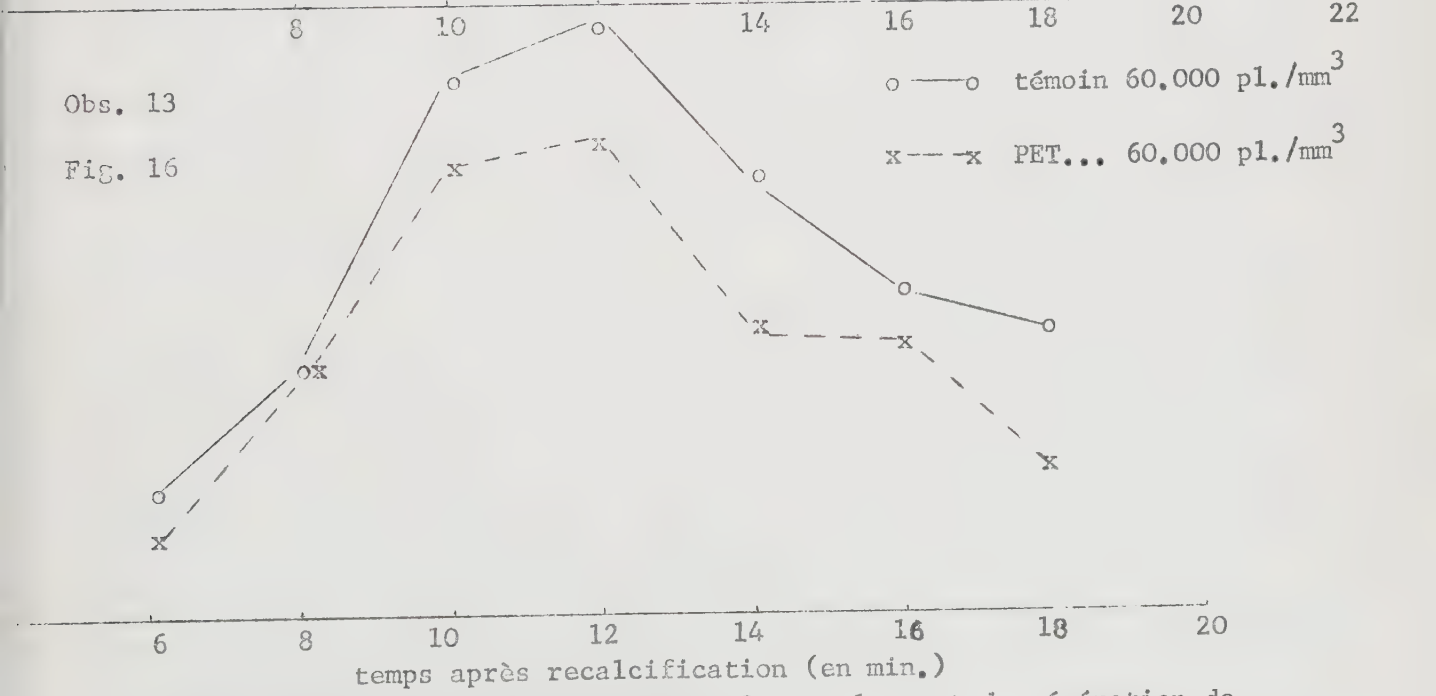
Fig. 15

test de génération de thrombine



Obs. 13

Fig. 16



Le dosage du facteur plaquettaire 3 par le test de génération de thrombine a donné des résultats tout à fait semblables chez ces 2 malades (Fig. 15 et 16). Les courbes obtenues sont parallèles aux témoins, les pics d'activité légèrement inférieures, mais celles-ci nous paraissent proches de la normale.

D I S C U S S I O N

L'élaboration de nouvelles techniques a permis de mieux connaitre le support chimique, la localisation, les propriétés et le mode d'action du facteur plaquettaire 3. Son rôle dans la pathologie est, par contre, resté obscur. Les espoirs conçus avec les dosages en présence de kaolin, après les déceptions du test de génération de thromboplastine, n'ont pas été confirmés. Suivant les conditions expérimentales, les traitements variés appliqués aux plaquettes, les réactifs utilisés, les résultats se sont révélés souvent contradictoires et les explications proposées rendues difficiles par des techniques non comparatives.

Nous avons utilisé des techniques biologiques dans des conditions strictement comparables. Les résultats ont été constamment parallèles entre la consommation de prothrombine et la génération de thrombine. Les quelques contrôles effectués par le temps de Stypven dans les mêmes conditions n'ont pas toujours été concluants. La technique de génération de thrombine nous a paru la plus intéressante et la plus riche en renseignements du fait de son caractère dynamique. Sa reproductibilité est bonne en général, mais des variations importantes ont parfois été notées à la fois dans la vitesse de génération et dans la quantité de thrombine générée. Ces différences peuvent être imputées à la difficulté de standardisation des suspensions plaquettaires, à l'activation spontanée des plaquettes en milieu hypercitraté, en particulier, selon les conditions de température dans lesquelles les plaquettes sont conservées.

Les conditions d'activation des plaquettes nous ont paru simples mais le rôle du milieu hypercitraté (acide citrique 0,13 M , citrate de sodium 0,126M, dextrose 2%) est important. Les contrôles faits en ce sens ont montré que dans un plasma pauvre en plaquettes substrat citraté à 3,8%, la libération du FP 3 était un peu plus précoce mais le pic d'activité sensiblement le même qu'en milieu hypercitraté. Nous pensions pouvoir imputer ces divergences à une différence de pH (l'anticoagulant hypercitraté à un pH à 4,6) ; mais il se tamponne en plasma substrat à pH 7,1 , tandis que le PPP citraté à 3,8% garde un pH à 7,3 .

Les résultats que nous avons obtenus dans les 3 cas de thrombasthénie sont en accord avec ceux des auteurs utilisant la génération de thromboplastine. Ils ont noté une génération normale, parfois augmentée. Les phospholipides totaux sont qualitativement et quantitativement normaux, et l'on peut supposer que les manipulations subies par les plaquettes dans le T.G.T. suffisent pour que le test rende compte de l'activité coagulante totale et non d'une libération de FP 3. Les tests utilisant une activation plaquettaire par le kaolin ont montré une diminution de la libération de FP 3, interprétée comme liée au défaut d'agrégation. Ces auteurs (26, 40) en présence de fortes concentrations d'ADP ont trouvé dans les thrombasthénies une diminution de la disponibilité du facteur plaquettaire 3. Il est logique de penser que le facteur plaquettaire 3 normal dans les thrombasthénies n'est pas "activé" ou rendu disponible en présence de kaolin ou d'ADP du fait de l'absence d'agré - gation de ces plaquettes, liée , sans doute, à une anomalie biochimique plaquettaire.

La DTH a toujours été considérée comme présentant un déficit en FP 3 reflété par une diminution de la consommation de prothrombine, de la génération de thromboplastine et de l'activité plaquettaire du sérum. La thrombopénie pratiquement constante au-delà de 5 ans pourrait être une première explication à ce déficit, mais il semble bien que dans les cas où le chiffre de plaquettes est normal ou subnormal, il existe également une consommation de prothrombine anormale.

Les différentes techniques de dosage du FP 3 utilisées jusqu'alors (TGT, tests au kaolin, Stypven) donnaient des résultats concordants dans le sens d'une diminution de la disponibilité du FP 3, sans qu'il existe un trouble d'agrégation plaquettaire. Par ailleurs, la concentration en phospholipides totaux est quantitativement, à chiffre de plaquettes égal, environ 20 fois supérieur à celle des plaquettes témoins (CULLUM). La répartition des différentes fractions est normale ainsi que leur activité coagulante in vitro. L'anomalie semble donc bien se situer au niveau de la membrane et de la libération (disponibilité) du FP 3.

Sans activation préalable, dans les deux systèmes utilisés, contrairement aux observations établies, nous avons trouvé une disponibilité du FP 3 nettement supérieure à la normale. Compte tenu de l'augmentation importante de la surface plaquettaire dans cette affection, ces résultats sont un argument supplémentaire au concept de l'intervention des

plaquettes dans la coagulation comme catalyseur de surface, par conséquent lié à la taille. Nous acceptons volontiers l'idée que cette activité biochimiquement reconnue aux phospholipides soit liée "in vitro" à une réorientation spatiale de ces lipides au niveau de la membrane plaquettaire.

Il n'en reste pas moins à expliquer l'allongement du temps de saignement d'une part, la diminution de la consommation de prothrombine d'autre part. Le rôle de la thrombopénie peut être ici repris mais sans qu'il puisse suffire. Au total, la pathogénie de cette affection reste parfaitement obscure et aucun critère de classification ne parait réellement convaincant en dehors du gigantisme plaquettaire, qui peut rendre compte de l'augmentation de la surface plaquettaire disponible où se ferait l'activation des facteurs de coagulation péri-plaquettaire.

Dans un seul cas d'allongement du temps de saignement, nous avons noté un désordre de la disponibilité du FP 3 et tous les autres nous ont paru normaux ou proches de la normale. Il semble qu'en l'état actuel des connaissances, il est concevable qu'à côté des allongements du temps de saignement avec déficit plasmatique, il en existe avec déficit plaquettaire et particulièrement en facteur plaquettaire 3. Il est possible que les deux anomalies : allongement du temps de saignement, déficit en FP 3, ne soient rien d'autre qu'une association sans relation de cause à effet. Il serait pourtant assez satisfaisant qu'une seule cause (peut-être membranaire) réponde de ces deux anomalies.

En accord avec certains auteurs utilisant le TGT (76,97), nous n'avons trouvé aucune anomalie évidente de la libération du FP 3 dans les 2 cas de syndrome myéloprolifératif que nous avons étudiés.

Ainsi, les techniques reproductibles de mesure du FP 3 que nous avons utilisées nous ont-elles permis de noter un FP 3 normal dans les thrombasthénies (il n'est anormalement disponible que dans les systèmes où l'agrégation plaquettaire joue un grand rôle), un FP 3 augmenté dans les dystrophies thrombocytaires hémorragipares. Ce résultat s'oppose complètement à ceux précédemment notés dans cette affection. Il pourrait être dû à des systèmes compétitifs de pro et d'anticoagulants dans l'atmosphère périplaquettaire. Dans un de ces 5 cas d'allongement du temps de saignement nous avons trouvé un déficit en FP 3 qui pourrait dans la nosologie actuelle s'apparenter au syndrome de Willebrand- Jürgens . Dans les 2 cas de syndrome myéloprolifératif enfin, nous avons été incapables dans les systèmes utilisés de déceler une anomalie du FP 3.

RESUME ET CONCLUSIONS

1. Les plaquettes sanguines interviennent dans toutes les phases de l'hémostase, c'est-à-dire, dans la ligature physiologique du vaisseau lésé, le clou plaquettaire; dans la coagulation du sang, au cours de la formation de la thromboplastine active endogène; et au cours de la fibrinolyse.

2. Le rôle du facteur plaquettaire 3 dans la coagulation a été reconnu grâce aux tests de consommation de la prothrombine et de la génération de la thromboplastine. Le déficit en facteur plaquettaire 3 (ou son anomalie d'activation) a servi de base à la différenciation de certaines thrombopathies congénitales (syndrome de Willebrand-Jürgens, dystrophie thrombocytaire hémorragipare etc...), ou acquises (urémies, leucémies myéloïdes chroniques).

3. L'unicité de ce "facteur", sa localisation membranaire, granulaire ou mixte, les méthodes de sa mesure et de sa disponibilité restent encore sujets à discussion.

4. Nous avons comparé plusieurs tests de mesure du facteur plaquettaire 3 et avons retenu comme base pour notre travail ceux qui étaient le plus reproductibles à plusieurs examens successifs : à concentration plaquettaire constante, nous avons comparé, dans des conditions rigoureusement identiques, les résultats obtenus par le test de génération de thrombine et la consommation de la prothrombine.
   Dans ces mêmes conditions, nous avons mesuré le facteur plaquettaire 3 disponibles :
   - en présence de kaolin (à la concentration de 1 mg par ml), la vitesse de formation de la thrombine est accélérée mais la quantité générée parait plus faible.
   - en présence d'Adénosine diphosphate (10 µg par ml), la vitesse de formation est identique à celle obtenue avec la suspension plaquettaire intacte témoin, mais la quantité de thrombine générée est un peu plus élevée.
   - après 3 congélations-décongélations, la vitesse est très accélérée et le pic d'activité très élevé.

5. Nous avons également étudié la disponibilité du facteur plaquettaire 3 chez des malades présentant une diathèse hémorragique.

- 3 cas de Dystrophie thrombocytaire hémorragipare, la vitesse de formation est normale et la quantité de thrombine formée est notablement augmentée.
- 3 cas de thrombasthénie ou maladie de Glanzmann , la vitesse de formation est normale et la quantité de thrombine formée légèrement augmentée.
- 5 cas d'allongement isolé du temps de saignement. Dans 3 observations, la vitesse de formation et la quantité de thrombine générée sont normales; dans un cas, il existe un retard de formation et une quantité de thrombine générée insuffisante. Enfin, dans un autre cas, l'anomalie du facteur plaquettaire 3 ne se retrouve qu'en présence d'un plasma déplaquettisé normal et non en présence du PPP homologue.
- 2 cas de syndrome myéloprolifératif dans lesquels la vitesse de formation et la quantité de thrombine générée sont normaux.

Vu, le Président de Thèse :

Pr Jean BERNARD

Vu, le Doyen de la Faculté :

Pr Georges BROUET

Vu et Permis d'Imprimer

le Recteur de l'Académie de Paris

Jean ROCHE.

BIBLIOGRAPHIE

1. ACHENBACH W., KLESPER R., MAURER K.
Eine empfind liche methode zur messung der thrombocyten factor 3 - Aktivität im thromboplastin generation test .
Klin. Wschr., 1958, 36, 585 .

2. ALAGILLE D., SOULIER J.P.
Le test d'activité plaquettaire du sérum .
Rev. Franc. Et. Clin. Biol., 1957, 2, 231 .

3. ALAGILLE D., JOSSO F., BINET J.L., BLIN M.J.
La dystrophie thrombocytaire hémorragipare . Discussion nosologique .
Nouv. Rev. Fr. Hémat., 1964, 4, 755 .

4. ALKJAERSIG N., TAKESHI A., SEEGERS W.H.
Purification and quantitative determination of platelet factor 3 .
Am. J. Physiol., 1955, 181, 304 .

5. ALTSCHULER G., MARCUS A.J., ULLMAN H.L.
Platelets and platelets phosphatides in uremia .
Blood, 1960, 16, 1439 .

6. BERNARD J., SOULIER J.P.
Sur une nouvelle variété de dystrophie thrombocytaire hémorragipare congé - nitale .
Sem. Hôp. Paris , 1948, 24, 217 .

7. BERNARD J., CAEN J., MAROTEAU P.
La dystrophie thrombocytaire hémorragipare congénitale .
Rev. Hémat., 1957, 12, 232 .

8. BIGGS R., DOUGLAS A.S.
The thromboplastin generation test.
J. Clin. Path., 1953, 6, 23 .

9. BIGGS R., EVELING J., RICHARD G.
The assay of antihaemophilic globulin activity .
Brit. J. Haemat., 1955, 1, 20 .

10. BLOMSTRAND R., NAKAYAMA T., NILSSON I.M.
Identification of phospholipids in human thrombocytes and erythrocytes .
J. Lab. Clin. Med., 1962, 59, 771 .

11. BONNIN J.A., CHENEY K.
The PFT test : an improved method for the estimation of platelet thrombo - plastic function .
Brit. J. Haemat., 1961, 7, 512 .

12. BORCHGREVINK C.F.
A method for measuring platelet adhesiveness in vivo .
Acta Med. Scand., 1960, 168, 157 .

13. BORN G.V.R.
Aggregation of blood platelets by ADP and its reversal .
Nature, 1962, 194, 927 .

14. BORN G.V.R., CROSS M.J.
The aggregation of blood platelets .
J. Physiol., 1963, 168, 178 .

15. BRAUNSTEINER H., PAKESCH F.
Thrombocytoasthenia and thrombocytopathia. Old names and new diseases .
Blood, 1956, 11, 965 .

16. BRINKHOUS K.M.

Am. J. Med. Sc., 1939, 198, 509 .

17. BUCKWALTER I.A., BLYTH W.B., BRINKHOUS K.M.
Effect of blood platelets on prothrombin utilisation of dog and human plasmas ?
Am. J. Physiol., 1949, 159 .

18. CAEN J., BERNARD J.
Les facteurs thromboplastiques plaquettaires .
Rev. Fr. Et. Clin. Biol., 1957, 2, 1038 .

19. CAEN J.
Le temps de Stypven .
Pathol. et Biol., 1961, 9, 1801 .

20. CAEN J., MICHEL H.
Agrégation des plaquettes à l'ADP . (Acide adénosine diphosphorique)
Rev. Franc. Et. Clin. Biol., 1964, 9, 999 .

21. CAEN J., MICHEL H.
L'activité agrégante du sérum (plasma défibriné par la thrombine) .
Rev. Franc. Et. Clin. Biol., 1964, 9, 1001 .

22. CAEN J., CASTALDI P.A., LECLERC J.C., INCKMAN S., LARRIEU M.J., PROBST M., BERNARD J.
Congenital bleeding disorders with long bleeding time and normal platelet count . I - Glanzmann thrombasthenia .
Am. J. Med., 1966, 41, 4 .

23. CAEN J., LARRIEU M.J., SAMAMA M., MANET L.
Méthodes d'exploration de l'hémostase .
Polycopie Gilanne, Paris , 1966 .

24. CAEN J., SINAKOS Z., SULTAN Y., VAINER H., BERNARD J.
Les troubles de fonctionnement des plaquettes dans les leucémies myéloïdes chroniques .
Nouv. Rev. Fr. Hémat., 1966, 6, 719 .

25. CAHALANE S.F., JOHNSON S.A., MONTO R.W., CALDWELL M.J.
Acquired thrombopathy : observation on the coagulation defect in uremia .
Am. J. Clin. Path., 1958, 30, 507 .

26. CASTALDI P.A., LARRIEU M.J., CAEN J.
Availability of platelet factor 3 and activation of factor XII in thrombas - thenia .
Nature, 1965, 207, 422 .

27. CHARGAFF E., BANCROFT F.W., STANLEY-BROWN M.
Studies on the chemistry of blood coagulation . III. The chemical constituants of blood and their role in blood clotting, with remarks on the activation of clotting by lipids .
J. Biol. Chem., 1936, 116, 237 .

28. DEYKIN D., PRITZER C.R., SCOLNICK E.M.
Plasma co-factors in ADP induced aggregation of human platelets .
Nature, 1965, 208, 296 .

29. DUKE W.W.
The relation of blood platelets to haemorrhagic diseases . Description of a method determining the bleeding time and coagulation time and report of three cases of hemorrhagic disease relieved by transfusion .
J. Amer. Med. Ass., 1910, 55, 1185 .

30. EPSTEIN E., QUICK A.J.
Effect of injecting platelet extract intravenously .
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1953, 83, 453 .

31. EWALD R.A., EICHELBERGER J.W., YOUNG A.A.
The effect of dextran on platelet factor 3 activity : in vivo and in vitro studies .
Transfusion (Philadelphia), 1965, 5, 109 .

32. FERGUSON J.H., MARCUS A.J., ROBINSON A.J.
Purified platelet phospholipids and blood coagulation .
Blood, 1963, 22, 19 .

33. FONIO A.
Neuere untersuchungen über die physiologie und pathologie der thrombozyten .
Ergeln. der inn Med. und Kinderheilkunde, 1953, 4, 1.

34. GAARDER A., JONSEN J., LALAND S., HELLEM A., OWREN P.A.
ADP in red cells as a factor in the adhesiveness of human blood platelets .
Nature, 1961, 192, 532 .

35. GAARDER A., LALAND S.
Hypothesis for the aggregation of platelets by nucleotides .
Nature, 1964, 202, 909 .

36. GAERTNER H., CAEN J.
L'érythroplastine : facteur coagulant des globules rouges. Relations avec la proaccélérine, la proconvertine et le facteur Stuart .
Path. Biol., 1961, 9, 1735 .

37. GROSS R., GEROK W., LOHR G.W., VOGELL W., NALLER H.D., THEOPOLD W.
Uber die natur der thrombasthenie : thrombopathie Glanzmann-Naegeli .
Klin. Wschr., 1960, 38, 193 .

38. HARDISTY R.M., DORMANDY K.M., HUTTON R.A.
Thrombasthenia ; Studies on three cases .
Brit. J. Haemat., 1964, 10, 371 .

39. HARDISTY R.M., HUTTON R.A.
The kaolin clotting time of platelet-rich plasma : a test of platelet factor 3 availability .
Brit. J. Haemat., 1965, 11, 269 .

40. HARDISTY R.M., HUTTON R.A.
Platelet aggregation and the availability of platelet Factor 3 .
Brit. J. Haemat., 1966, 12, 764 .

41. HARTERT H.
Thromboelastographische untersuchungen zur retraction .
Klin. Wschr., 1950, 28, 78 .

42. HELLEM A.J.
The adhesiveness of human blood platelets in vivo .
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1960, 12, Suppl. 51 .

43. HJORT P., RAPAPORT S.I., OWREN P.A.
A simple, specific one-stage prothrombin assay using Russell's viper venom.
J. Lab. Clin. Med., 1955, 46, 89 .

44. HOROWITZ H.I., RAPAPORT H.I., YOUNG R.C., FUSIMOTO M.M.
Change in platelet factor 3 as a mean of demonstrating immune reaction involving platelet : its use as a test for quinidine induced thrombocytopenia .
Transfusion, 1965, 5, 336 .

45. HOROWITZ H.I., DESPREZ R.M., HOCK E.W.
Effect of bacterial endotoxine on rabbit platelets . Enhancement of platelet factor 3 activity in vitro and in vivo .
J. Exp. Med., 1962, 116, 619 .

46. HOROWITZ H.I., MARCUS A.J.
The development of platelet factor 3 activity by latex particles ; an interaction with plasma .
Blood, 1964, 23, 178 .

47. HOROWITZ H.I.
Platelet factor 3 in platelet release reactions .
First International Symposium on blood platelets, Viviana Luckaus Foundation Buenos-Aires, 1965 .

48. HOROWITZ H.I.
How the platelet factor 3 of blood platelets enters into coagulation reactions
J. Clin. Invest., 1966, 45, 1025 .

49. HOVIG T.
Release of a platelet aggregation substance (ADP) from rabbit blood platelets induced by saline "extract" of tendons .
Thromb. Diath. Haemorr., 1963, 9, 267 .

50. HOVIG T.
The effect of Calcium and Magnesium on rabbit blood platelet aggregation in vitro .
Thromb. Diath. Haemorr., 1964, 12, 179 .

51. HOWELL W.H.
The nature and action of the thromboplastic (zymoplastic) substance of the tissues .
Am. J. Physiol., 1912, 13, 1.

52. HUGUES J.
Facteurs locaux du premier temps de l'hémostase .
Acta Haemat., 1966, 36, 109 .

53. HUSOM O.
A one stage method for the assay of platelet factor 3.
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1961, 13, 609 .

54. INCEMAN S., CAEN J., BERNARD J.
Aggregation, adhesion and viscous metamorphosis of platelets in congenital fibrinogen deficiencies .
J. Lab. Clin. Med., 1966, 68, 21 .

55. IVY A.D., NELSON D., BUCHES G.
The standardisation of certain factors in the cutaneous "hemostasis" bleeding time technique .
J. Lab. Clin. Med., 1941, 26, 1222 .

56. IZARN P.
Les anomalies de l'hémostase au cours des hémopathies malignes .
Nouv. Rev. Fr. Hémat., 1966, 6, 700 .

57. JOHNSON S.A., MONTO R.W., CALDWELL M.J.
A new approach to the thrombocytopathies . Thrombopathy A.
Thromb. Diath. Haemorr., 1958, 2, 279 .

58. JOHNSON S.A., MONTO R.W., REBUCK J.W.
Specific platelet alterations related to hematological disorders .
Blood Platelets, Henry Ford Hospital International Symposium
ed. Little, Brown and Co., Boston, 1961, 523 .

59. LARRIEU M.J., CAEN J., LELONG J.C., BERNARD J.
Maladie de Glanzmann . Etude clinique, biologique et pathogénique . A
propos de cinq observations .
Nouv. Rev. Fr. Hémat., 1961, 1, 662 .

60. LEE R.I., WHITE P.D.
A clinical study of the coagulation time of blood .
Am. J. Med. Sc., 1913, 145, 495 .

61. LUSCHER E.F., BETTEX-GALLAND M.
Aspects biochimiques de l'hémostase .
J. Physiol., 1961, 53, 145 .

62. MARCUS A.J., SPAET T.H.
Platelet phosphatides : their separation, identification and clotting
activity .
J. Clin. Invest., 1958, 37, 1836 .

63. MARCUS A.J., ULLMAN H.L., HANAHAN D.J.
Studies on blood platelet phospholipids .
J. Lipid Res., 1960, 1, 179 .

64. MARCUS A.J.
Blood Platelets . Henry Ford Hospital International Symposium
ed. Little, Brown and Co., Boston, 1961, 587 .

65. MARCUS A.J., ULLMAN H.L., SAFIER L.B., BALLAND H.S.
Platelet phosphatides, their fatty acid and aldehyde composition and activity in different clotting systems .
J. Clin. Invest., 1967, 41, 2198 .

66. MARCUS A.J., ZUCKER-FRANKLIN D.
Enzyme and coagulation activity of subcellular platelet fractions .
J. Clin. Invest., 1964, 43, 1241 .

67. MARCUS A.J., ZUCKER-FRANKLIN D.
Studies on subcellular platelet particles .
Blood, 1964, 23, 389 .

68. MARCUS A.J., ZUCKER-FRANKLIN D.
Human platelet lipids and their relationship to blood coagulation .
Journal of american oil chemistry society, 1965, 42 .

69. MARCUS A.J., ZUCKER-FRANKLIN D., SAFIER L.B., ULLMAN H.L.
Studies on human platelets granules and membranes .
J. Clin. Invest., 1966, 45, 14 .

70. [illegible] D.
Recherches sur les granules plaquettaires .
Le Sang, 1959, 30, 114 .

71. O'BRIEN J.R.
The platelet-like activity of serum .
Brit. J. Haemat., 1955, 1, 223 .

72. O'BRIEN J.R.
The similarity of the action of phosphatidyl ethanolamine and platelets in blood coagulation .
J. Clin. Pathol., 1956, 9, 47 .

73. OWREN P.A., AAS K.
The control of dicoumarol therapy and the quantitative determination of prothrombin and proconvertin .
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1951, 3, 201 .

74. PAPAHADJOPOULOS D., HOUGIE C., HANAHAN D.J.
Influence of surface charge of phospholipids on their clot-promoting activity .
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1962, 111, 412 .

75. PARQUET-GERNEZ A., GOUDEMAND M., CHRISTIAENS L.
La thrombasthenie de Glanzmann-Naegeli ; Considerations cliniques et biologiques .
Pédiatrie, 1964, 19, 723 .

76. PERRY S., BAKER M.
Coagulation defects in leukaemia .
J. Lab. Clin. Med., 1957, 50, 229 .

77. PIETTE M., PIETTE C.
Numération des plaquettes sanguines utilisant un liquide hypotonique à base de chlorhydrate de procaïne .
Le Sang, 1959, 30, 144 .

78. PITNEY W.R., DACIE J.V.
A simple method of studying the generation of thrombin in recalcified plasma.
J. Clin. Path., 1953, 6, 9 .

79. QUICK A.J.
The prothrombin in hemophilia and in obstructive jaundice .
J. Biol. Chem., 1935, 109, 73 .

80. QUICK A.J.
Studies on the enigma of the hemostatic dysfunction of hemophilia .
Amer. J. Med. Sci., 1947, 214, 272 .

81. SALZMAN E.W.
Measurement of platelet adhesiveness . A simple in vitro technique demonstrating an abnormality in Von Willebrand disease .
J. Lab. Clin. Med., 1963, 62, 724 .

82. SALZMAN E.W., CHAMBERS D.A., NERI L.L.
Possible mecanism of aggregation of blood platelets by ADP .
Nature, 1966, 210, 167 .

83. SCHULTZ H., JURGENS R., HIEPLER E.
Die ultrastruktur der thrombozyten bei der konstitutionellen thrombopathie (v. Willebrand-Jürgens) mit einem beitrag zur submikroskopischen ortologie der thrombozyten .
Thromb. Diath. Haemorr., 1958, 2, 300 .

84. SILVER M.J., TURNER D.L., RODALEWICZ I.
Evaluation of activity of phospholipids in blood coagulation in vitro .
Thromb. Diath. Haemorr., 1963, 19, 164 .

85. SINAKOS Z., CAEN J.
Une technique simple, quantitative de mesure de l'agrégation plaquettaire .
Rev. Fr. Et. Clin. Biol., 1966, 11, 539 .

86. SOULIER J.P.
La consommation de la prothrombine pendant la coagulation du sang veineux et du sang capillaire . Nouvelle méthode d'investigation des syndromes hémorragiques .
Rev. Hémat., 1948, 3, 3 .

87. SOULIER J.P., LARRIEU M.J.
Etude analytique des temps de Quick allongés : dosage de prothrombine, proconvertine et de proaccélérine .
Sang, 1952, 23, 7 .

88. SOULIER J.P., LARRIEU M.J.
Nouvelle méthode de diagnostic de l'hémophilie . Dosage des facteurs antihémophiliques A et B .
Sang, 1953, 24, 204 .

89. SOULIER J.P., LARRIEU M.J.
Syndrome de Willebrand-Jürgens et thrombopathies . Etude de 65 cas. Essai de classification .
Rev. Hemat., 1954, 9, 77 .

90. SOULIER J.P., LARRIEU M.J., WARTELLE O.
La thromboplastinoformation dans les affections plaquettaires .
Acta Haematologica, 1955, 14, 160 .

91. SPAET T., CINTRON J.
Studies on platelet factor 3 availability .
Brit. J. Haemat., 1965, 11, 269 .

92. TROUP S.B., REED C.F., MARINETTI G.V., SWISHER S.N.
Thromboplastic factors in platelets and red cells : observation on their chemical nature and function in "in vitro" coagulation .
J. Clin. Invest., 1960, 39, 342 .

93. ULUTIN O.N., KARACA M.
Investigations on the platelet defect of thrombopathia .
Proceeding of the VIIth International congress of the International Society of Haematology, Rome, 1958 .

94. ULUTIN O.N.
The qualitative platelet diseases .
Blood Platelets. Henry Ford Hospital International Symposium .
Little, Brown and Co., Boston, 1961, 553 .

95. VON WINCKELMANN G., WALTHER C.
Zur frage der vermiinderter plättchenfaktor 3 . Aktivit"at beim v. Willebrand -Jürgens syndrom .
Fol. Haemat. N.F., 1964, 9, 119 .

96. WEISS H.J., EICHELBERGER J.W.
The detection of platelet defects in patients with mild bleeding disorders . Use of a quantitative assay for platelet factor 3 .
Am. J. Med., 1962, 32, 872 .

97. WEISS H.J., EICHELBERGER J.W.
Secondary thrombocytopathia . Platelet factor 3 in various disease states.
Arch. Int. Med., 1963, 112, 827 .

98. WHITE J.G., KRIVIT W.
The ultra structural localisation and release of platelet lipids .
Blood, 1966, 27, 167 .

99. WODSWORTH A., MALTAUER F., MALTAUER E.
A study of the coagulation of blood : the chemical reaction underlying the process .
Am. J. Physiol., 1927, 80, 502 .

100. WOODSIDE E.E., THERRIAULT D.C., KOCHOLATY W.
Lipids of human platelets and their action on the blood coagulation process.
Blood, 1964, 24, 76 .

101. WOOLRIDGE L.C.
The coagulation question .
J. Physiol., 1889, 10, 329 .

102. ZILVERSMIT R.D., MARCUS A.J., ULLMAN H.L.
Plasmalogen in human blood platelets .
J. Biol. Chem., 1961, 236, 47 .

103. ZUCKER M.B., PERT J.H., HILGARTNER M.W.
Platelet function in a patient with thrombasthenia .
Blood, 1966, 28, 524 .